

**Die Wirksamkeit von Obidoxim
im Zentralnervensystem und in der Peripherie
bei der Parathion - Vergiftung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Brigitte-Silvie Bitter
aus Osnabrück**

1972

**Die Wirksamkeit von Obidoxim
im Zentralnervensystem und in der Peripherie
bei der Parathion - Vergiftung**



Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Brigitte-Silvie Bitter

aus Osnabrück



1. Referent: Professor Dr. H. Kewitz
2. Referent: Professor Dr. G. Schenck
3. Referent: Professor Dr. K.-H. Frömming

Tag der mündlichen Prüfung: - 7. JUNI 1972

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für
Klinische Pharmakologie im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin unter der Leitung
von Herrn Professor Dr. Helmut Kewitz durchge-
führt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr.med.
Helmut Kewitz, möchte ich für die Betreuung meiner
Arbeit und die Anregung für weitere Aufgaben in der
Pharmakologie,

meinem ehem. Lehrer, Herrn Professor Dr.phil. Ger-
hard Schenck, möchte ich für die wohlwollende Über-
nahme der Arbeit aufrichtig danken.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. <u>Einleitung</u>	1
1. Einführung	1
2. Messung der Enzymaktivität	3
3. Differenzierung der Esterasetypen	4
4. Reaktionsweise der Cholinesterase	5
5. Relevanz der Blutesterasen für den Verlauf von Vergiftung und Reaktivierung im Or- ganismus	7
B. <u>Material und Methode</u>	9
<u>Material</u>	
I. Chemikalien, Pharmaka	
1. Lösungen für die Bestimmung der Cholin- esteraseaktivität	9
2. Alkylphosphate zur Hemmung der Cholin- esterase	9
3. Reaktivatoren	10
4. Andere Pharmaka	10
II. Versuchstiere	11
1. Hunde	11
2. Mäuse	11
III. Apparative Ausrüstung	11
<u>Methode</u>	
1. Aktivitätsbestimmung in Blutproben	12
a) Plasma	13
b) Erythrozyten	13
2. Aufarbeitung und Aktivitätsbestimmung von Gewebeproben	14
3. Ablauf der Versuche beim Hund	14
4. Gewinnung von Gewebeproben	15
C. <u>Ergebnisse</u>	16
I. Untersuchungen zur Ermittlung optimaler Bedingungen zur Esterasebestimmung	16

	<u>Seite</u>
II. In vitro-Versuche	21
1.a. Hemmung von Plasmacholinesterase	21
1.b. Reaktivierung von Plasmacholinesterase	21
2.a. Hemmung von Erythrozyten-AChE im Hämolysat	26
2.b. Reaktivierung der Erythrozyten-AChE im Hämolysat	26
3. Hemmung und Reaktivierung der Azetylcholinesterase intakter Erythrozyten im Blut in vitro	35
4. Hemmung und Reaktivierung der Cholinesterasen in Plasma und Erythrozyten im Blut von Hunden	38
III. In vivo-Untersuchungen	47
I. Versuche am Hund	
1. Esteraseaktivität im Blut eines Parathion-vergifteten Hundes vor und nach Anwendung von Obidoxim	47
2. Esteraseaktivität in Blut, Muskel und Hirnrinde beim Hund nach Parathion-Vergiftung und Behandlung mit Obidoxim	48
3. Reaktivierung der Cholinesterase in der Hirnrinde und in den Stammganglien des Gehirns beim Hund	57
4. Übersicht über die Ergebnisse der Experimente am Hund	67
II. Bestimmung der Esteraseaktivität im Gehirn der Maus nach Paraxon-Vergiftung und nach Behandlung mit Obidoxim	69
III. Cholinesterase-Aktivität in einzelnen Hirnregionen eines an E 605 ^R -Vergiftung gestorbenen Patienten	76
IV. Esteraseaktivität im Blut bei zwei Patienten nach Parationvergiftung und Reaktivierung in vitro	78
D. <u>Diskussion</u>	87
E. <u>Zusammenfassung</u>	94
Literaturverzeichnis	96

A. Einleitung

1. Einführung

Die gezielte Entwicklung von Reaktivatoren der durch Alkylphosphate gehemmten Cholinesterasen basierte auf der genauen Kenntnis der molekularen Reaktionsweise zwischen Hemmstoff und Enzym. Die Arbeiten hierüber waren von fundamentaler Bedeutung, weil sie zeigten, daß sich die für die beabsichtigte Wirkung erforderliche chemische Struktur neuer Arzneimittel im voraus errechnen und entwerfen läßt, wenn die Affinitäten und Bindungskräfte der Reaktionspartner bekannt sind.

So entstanden die ersten Aldoxime, die nicht nur in vitro die durch Alkylphosphate hervorgerufene Hemmung von Cholinesterasen aufheben können, sondern auch bei vergifteten Tieren kausal therapeutisch wirksam sind (KEWITZ et WILSON 1956, KEWITZ, NACHMANSOHN et WILSON 1956, KEWITZ 1957). Daraus ergab sich die klinische Anwendung der Stoffe beim Menschen, die in vielen Fällen lebensrettend war (NAMBA, HIRAKI 1958, ERDMANN 1958 u.a.).

In den letzten Jahren haben jedoch einige Toxikologen und Kliniker den therapeutischen Nutzen dieser Antidote in Zweifel gezogen. Dadurch sind viele Ärzte unsicher geworden, so daß weitere Untersuchungen über die Grenzen der Wirksamkeit notwendig waren. Diese sollten so angelegt sein, daß die Befunde nach Möglichkeit Rückschlüsse für die Therapie beim Menschen gestatten würden.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Versuchstier der Hund gewählt, da die Cholinesterasen dieser Spezies den

menschlichen sehr ähnlich sind (AUGUSTINSSON 1959); außerdem lassen sich beim Hund besser als bei kleineren Labortieren bestimmte Areale des Gehirns abgrenzen und separat untersuchen.

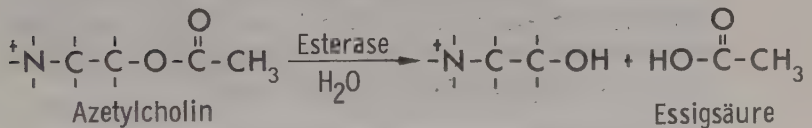
Bisher war unklar, ob die gebräuchlichen Aldoxime im Gehirn überhaupt wirksam sind. Da bei Mäusen und Ratten keine Reaktivierung der Azetylcholinesterase des Gehirns gefunden wurde, nahm man allgemein an, daß der für den therapeutischen Nutzen wesentliche Effekt durch eine Reaktivierung der Azetylcholinesterasen im peripheren Nervensystem zustande kommt. Bei den kleineren Laboratoriumsnagern war stets die Esteraseaktivität im gesamten Gehirn bestimmt worden, so daß die Ergebnisse keine Aussage über die Wirksamkeit in einzelnen Hirnabschnitten erlaubten.

Durch getrennte Untersuchungen der Hirnrinde, des Thalamus, des Nucleus caudatus, des Nucleus lentiformis, der Medulla oblongata und des Kleinhirns konnte eine Differenzierung vorgenommen werden. In der Peripherie wurde die Aktivität der Cholinesterasen des Plasmas, der Erythrozyten, des Zwerchfells, der Herzmuskulatur und der geraden Bauchmuskeln bestimmt. Dadurch war es möglich, die Wirksamkeit des Reaktivators an verschiedenen Stellen des Körpers gleichzeitig zu prüfen sowie eine Korrelation zu den Blutwerten aufzustellen. Unter den Bedingungen der klinischen Praxis können nur die Cholinesterasen des Blutes untersucht werden.

2. Messung der Enzymaktivität

Die Mehrzahl der gebräuchlichen Methoden zur Messung der Cholinesterase-Aktivität beruhen auf dem Nachweis der durch Esterspaltung freigesetzten Säure.

Reaktiosschema :



Übersichten über die Methoden geben AUGUSTINSSON (1963), WITTER (1963), GAGE (1967), ALDRICH (1969).

Ergebnisse verschiedener Methoden können nur nach deren Standardisierung miteinander verglichen werden (PEARSON und WALKER 1968).

Den titrimetrischen Verfahren liegt die Bestimmung der pro Zeiteinheit freiwerdenden Essigsäure mit äquivalenter Menge Alkali zugrunde. Die elektrometrische Methode (MICHEL 1949) ist im Vergleich zur manometrischen im WARBURG-Apparat einfach auszuführen und genau genug, um niedrige Aktivitäten, wie sie bei gehemmtem Enzym, in tierischem Blut u.a. vorkommen, zu erfassen.

Verschiedene Modifizierungen dieser Methode sind be-

beschrieben worden (AUGUSTINSSON 1957, PICKERING 1970). Für die experimentell wissenschaftlichen wie klinisch toxikologischen Untersuchungen dieser Arbeit war die Messung bei konstantem pH mit Hilfe einer automatischen Titrationsausrüstung geeignet (JENSEN-HOLM 1959, NABB und WHITFIELD 1967).

3. Differenzierung der Esterasetypen

Hinsichtlich physiologischer und biochemischer Eigenschaften wird die "pseudo"-Cholinesterase von der "wahren" unterschieden. Gemeinsam ist ihnen, daß sie Cholinester schneller spalten als andere Ester.

Die Azetylcholinesterase, AChE (E.C.3.1.1.7.) ist im gesamten Nervengewebe überwiegend vorhanden. Außerdem ist sie Bestandteil der Erythrozytenmembran.

Die Pseudocholinesterase, ChE (E.C.3.1.1.8.) ist überwiegend im Serum, ferner in Leber, Pankreas und Haut lokalisiert.

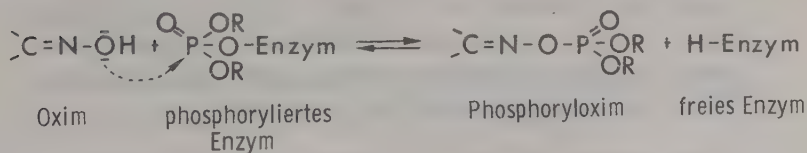
Übersichten vermitteln AUGUSTINSSON (1960, 1963) und COHEN (1963).

Die beiden Esterasen besitzen eine unterschiedliche Affinität zu Cholinestern. Die Azetylcholinesterase spaltet Azetylcholin schneller als Propionyl- und Butyrylcholin, die Cholinesterase setzt BuCh und PrCh schneller als Azetylcholin um (AUGUSTINSSON 1949). Auch mit Hilfe phosphororganischer Verbindungen lassen sich beide Esterasetypen differenzieren (ALDRIDGE 1953).

4. Reaktionsweise der Cholinesterase

Cholinesterasen reagieren mit organischen Phosphorsäureestern und Phosphonsäureestern ähnlich wie mit dem physiologischen Substrat Azetylcholin. Statt des azetylierten entsteht ein phosphoryliertes Enzym (WILSON 1951, NACHMANSON 1947, 1955). Die kovalente Bindung zwischen dem Phosphoratom des Alkylphosphatmoleküls und der esteratischen Seite des Enzyms wird jedoch schwerer hydrolysiert als die der Carbonylverbindung; dadurch bleibt das Enzym länger besetzt. Substanzen, die stärker nukleophile Eigenschaften als Wasser besitzen, vermögen die Phosphorylgruppe von der esteratischen Seite abzulösen. Dieses gelang WILSON bereits 1952 mit Hydroxylamin und Cholin. Eine Reaktivierung gelingt umso besser, je größer die Affinität des Reaktivatormoleküls zur Oberfläche der phosphorylierten Cholinesterase ist. Dazu gehören die Bindung des quartären Stickstoffs an die anionische Seite, die nukleophile Kraft des Sauerstoffs in der Oximgruppe gegenüber dem Phosphorsäurerest sowie sterische Eigenschaften, die komplementär zum Esterasemolekül ausgerichtet sind.

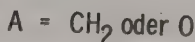
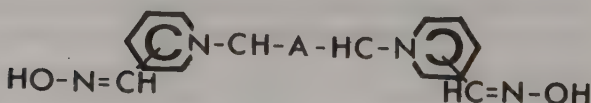
Reaktionsschema :



Die Reaktion ist reversibel, das Produkt kann in einer Rückphosphorylierung wiederum das Enzym azylieren (LAMB 1964, SCHOENE 1972).

Die erste als Antidot verwendete Verbindung dieser Gruppierung war 2-PAM (2-Hydroxyiminomethylpyridinmethyljodid, Pralidoxim, WILSON 1955). Später wurden bisquartäre Pyridiniumaldoxime entwickelt (HOBBIGER 1960, LÜTTRINGHAUS 1964, ENGELHARD 1967, POZIOMEK 1968) und als Reaktivatoren zur klinischen Behandlung bei der Alkylphosphat-Vergiftung empfohlen (ENGELHARD et ERDMANN 1963, 1964).

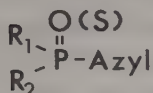
Allgemeine Formel:



Als spezifisches Antidot bei Vergiftungen mit phosphororganischen Verbindungen wurde Toxogonin^R (Bis-4-hydroxyiminomethylpyridin, (1)-methyl-ätherdichlorid, Obidoxim) eingeführt (ERDMANN et v. CLARMANN 1963). Diese Substanz wurde in den im Folgenden beschriebenen Versuchen zur Reaktivierung der gehemmten Cholinesterasen verwendet, da es das z.Z. handelsübliche Pharmakon ist.

Allen organischen Phosphor- und Phosphonsäureestern, die als Kontaktinsektizide Bedeutung erlangt haben, die aber auch für den Säugetierorganismus toxisch sind, liegt ein einheitliches Bauprinzip zugrunde (SCHRADER 1957).

Allgemeine Formel:



R = Alkyl- oder Alkoxygruppe

AzyI = F, CN, Phenol- oder Enolrest

Eines der bekanntesten Handelspräparate ist E 605^R (0,0-Diäthyl-O-p-nitrophenylthiophosphat, Parathion), welches heute noch den größten Teil der durch Alkylphosphate verursachten akzidentellen oder suizidalen Intoxikationen ausmacht (KNOLLE 1970). Deshalb und weil bei diesen Aldoxime besonders gut wirksam sind, wurde im Experiment am Hund dieses Mittel gewählt. Vergiftungen bei Mäusen sowie in vitro-Hemmungen wurden mit Paraoxon (0,0-Diäthyl-O-p-nitrophenylphosphat, E 600, Mintacol^R) durchgeführt, das im Organismus aus Parathion durch Umwandlung in der Leber als eigentlicher esterasehemmender Wirkstoff gebildet wird (DIGGLE 1951). Das Ergebnis der durchgeführten Experimente läßt sich nicht für die gesamte Stoffklasse der Alkylphosphate verallgemeinern.

5. Relevanz der Blutesterasen für den Verlauf von Vergiftung und Reaktivierung im Organismus

Die Hemmung der Cholinesterasen erfolgt außer im Blut in allen vegetativen Synapsen, an den parasymphatischen

Nervenendigungen, an der motorischen Endplatte und im Zentralnervensystem. An diesen Orten sorgt das Enzym physiologischerweise für den Abbau von Azetylcholin, einer der Überträgersubstanzen im Nervensystem. Die Vergiftungserscheinungen treten daher an allen vegetativ innervierten Organen und im Zentralnervensystem als Folge einer Akkumulation von Azetylcholin auf. Die Lähmung der Atemmuskulatur wird als Haupttodesursache angesehen (FRAWLEY 1952). Ob die cholinergen Mechanismen im Zentralnervensystem für das Überleben bei einer Alkylphosphatvergiftung entscheidend sind, ist bis heute nicht abgeklärt.

Die Beurteilung der Wirkung von Esterasereaktivatoren ist dadurch erschwert, daß je nach aufgenommener Giftdosis das klinische Vergiftungsbild sehr variiert. Die Aktivitätsbestimmung der Blutesterasen wird zur Diagnose und zur Verlaufskontrolle, besonders unter Antidottherapie herangezogen. Dazu sollten Plasma- und Erythrozytenesterase nebeneinander bestimmt werden (ERDMANN 1968, BARCKOW 1969), und nicht - wie in einigen Arbeiten (HEITMANN 1970, KUNST 1970) - lediglich die Plasma-Cholinesterase. Die Notwendigkeit der getrennten Untersuchung beider bestätigten die eigenen Versuche. Darüber hinaus erwies sich für die Indikation zur Oximtherapie bei Parathionvergiftungen eine zusätzliche in vitro-Inkubation der Probe mit dem Reaktivator als unerlässlich.

Während Obidoxim die Azetylcholinesterase im Blut, an den Ganglien und im Muskel in vivo zu reaktivieren vermag (HAHN et HENSCHLER 1969, HOBBIGER 1963), ist bisher nur von geringer Reaktivierung der Hirnesterase berichtet worden (MILOSEVIC 1966, HOBBIGER 1967, ERDMANN 1965).

Soll der Reaktivator die gehemmten Hirnfunktionen wiederherstellen, muß er diejenigen Zentren im Zentralnervensystem erreichen, in denen das Alkylphosphat die Azetylcholinesterase gehemmt hat. Es wurde daher die Frage nach einem möglichen Durchdringen der Blut-Hirnschranke für Obidoxim zu klären versucht.

B. Material und Methode

Material

I. Chemikalien, Pharmaka

1. Lösungen für die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität

Als Titrant wurde 0,01 N Natronlauge verwendet (hergestellt aus 0,1 N NaOH Merck, Darmstadt).

Zur Verdünnung von Plasma, Erythrozytenhämolysat und Gewebehomogenaten wurde 0,9 %ige Natriumchloridlösung gebraucht (NaCl p.A. Merck, Darmstadt).

Als Substrat diente Azetylcholin als Jodid in Stammlösungen von 2×10^{-1} M/l und 5×10^{-2} M/l (AChJ Schuchardt, München).

Blutproben wurden mit Heparin-Natrium (Schuchardt, München) ungerinnbar gemacht.

2. Alkylphosphate zur Hemmung der Cholinesterase

- a) Neostigmin-bromid (Merck, Darmstadt) zur Anwendung in vitro bei Plasma
- b) Mintacol^R (NaCl-Verreibung mit 1,66 % Wirkstoff (Bayer, Leverkusen) zur Anwendung in vitro und in vivo bei Mäusen

- c) Parathion, als E 605 forte^R (50 %ige ölige Lösung Bayer-Pflanzenschutz, Leverkusen). Das Präparat wurde 1:100 in Wasser emulgiert an Hundeverabreicht.

3. Reaktivatoren

- a) 2-PAM (2-Hydroxyiminomethylpyridin-(1)-methyljodid Schuchardt, München)
- b) Obidoxim (Bis-4-hydroxyiminomethylpyridin-(1)-methylätherdichlorid, Toxogonin^R Merck, Darmstadt).
0,5 ml der handelsüblichen Ampulle (250 mg/ml mit 3 ml H₂O ergaben eine 10⁻¹ molare Stammlösung.

Als Antidot in vivo wurde ausschließlich Obidoxim angewendet.

4. Andere Pharmaka

Atropinsulfat (Merck, Darmstadt) 1 mg/kg subkutan, gelöst in 0,5 ml NaCl-Lösung.

Polamivet^R (Farbwerke Hoechst) intravenös, zur Neuroleptanalgesie.

Nembutal^R (Pentobarbital-Natrium, 50 mg/ml, Deutsche Abbot GmbH, Ingelheim a.Rh.) zur Narkose, 0,25 mg/kg intravenös.

Ponsital^R (3-Chlor-10-{ γ -[N'- β' -(1"-methyl-2"-oxo-imidazolidinyl-3")-äthyl-N-piperazinyl]-propyl]-phenothiazin. dihydrochloric, Neuroleptikum der Asta-Werke, Brackwede) intramuskulär.

Urethan (Merck, Darmstadt, 12,5 %ige Lösung, 1,25 g/kg intraperitoneal.

II. Versuchstiere

1. Hunde

Für die Versuche standen 16 Bastardhunde beiderlei Geschlechts, geliefert von der Firma H. Stock, Gelnhausen, zur Verfügung. Die Tiere wurden mit der Hundenahrung "PAL" gefüttert.

2. Mäuse

Konventionell gehaltene weibliche NMRI/Han-Mäuse wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover bezogen. Die Tiere hatten ein Gewicht von 28-30 g. Das Futter bestand aus Standarddiät "Altromin" R-10.

III. Apparative Ausrüstung

Die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität erfolgte mit der automatischen Titrierausrüstung (Radiometer Copenhagen) für pH-Stat-Registrierung. Die Einheit besteht aus folgenden Geräten:

Automatische Bürette (ABU 1b) mit Rührmotor,
Glas- und Kalomelelektrode, Mikrobechern,
Titrator 11
pH-Meter 26
Titrigraph (SBR 2c)

Ergänzt wurde das Zubehör durch ein Thermostat (Ultra-Thermostat, Colora) mit Thermostatmantel für das Reaktionsgefäß. Zur Begasung wurde Stickstoff aus der Druckflasche in das Titrationsgefäß geleitet.

Die zur Konstanthaltung des vorgegebenen pH-Wertes nötige Menge Titrant wurde durch das Potential der Glaselektrode

gesteuert und aus der Bürette in das Reaktionsgefäß gegeben.

Die Berechnung der Esteraseaktivität erfolgte aus der Titrationskurve im Diagramm, die angibt, welche Menge Titrant pro Zeiteinheit verbraucht wurde. Die Steigung der Geraden ergibt Mol freigesetzte Essigsäure pro Zeiteinheit.

Gefäße mit Blutproben in Kapillaren zur Mikro-hämatokrit-Bestimmung wurden in der Ecco-Quick Zentrifuge drei Minuten bei 10 000 U/min zentrifugiert.

Zum Homogenisieren wurde der Ultra-Turrax (Janke & Kunkel KG., Staufen i.Br.) verwendet.

Homogenate von Mäusegehirnen wurden mit Hilfe des Glas-Homogenisators mit Teflon-Pistill nach Potter-Elvehjem (B. Braun, Melsungen) hergestellt.

Das Gewicht von Gewebeproben wurde mit der Mikrowaage, Wägebereich 0 g bis 120 g (Mettler, Schweiz) bestimmt.

In den Hundexperimenten 1) bis 3) wurde nach Tracheotomie eine Atempumpe angeschlossen.

Zum Öffnen des Schädels wurde eine Bohrmaschine (Reco-Dental Modell 1965, Wiesbaden) mit Handstück und Lindemann-Fräse benutzt.

Methode

1. Aktivitätsbestimmung in Blutproben

Frischblut wurde mit einer nicht abgewogenen Menge im Milligramm-Bereich Heparin-Na in Substanz ungerinnbar gemacht.

a) Plasma

Nach Zentrifugation in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (ca. 1,5 ml Fassungsvermögen) wurde das Plasma von den Erythrozyten abgehoben. Je nach Esteraseaktivität wurden entweder 0,1 oder 0,2 ml mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1,8 ml aufgefüllt und zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

Vor Zugabe des Substrats in den Titrationsansatz wurde die Plasmalösung, die einen pH-Wert über 7,4 aufwies, mit 1 Tropfen 0,1 N HCl angesäuert und dann mit Titrant auf pH 7,4 gebracht. Blieb der pH-Wert konstant, erfolgte der Zusatz von 0,2 ml der 2×10^{-1} molaren ACh-Stammlösung, so daß eine Konzentration von 2×10^{-2} M/l vorlag.

Zur Prüfung der Reaktivierbarkeit der Plasmaesterase in vitro wurde unverdünntes Plasma mit 10^{-3} M/l Obidoxim sechs Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann die Esteraseaktivität bestimmt, wie oben angeführt.

b) Erythrozyten

Nach zweimaligem Waschen der Erythrozyten mit 0,9 %iger Kochsalzlösung wurde von den dicht gepackten Erythrozyten die Leukozytenschicht ("buffy-coat") abgesaugt und durch Zugabe von Wasser zu den Erythrozyten ein 20 %iges Hämolysat (g/g) hergestellt. Davon dienten 0,2, 0,5 oder 1 ml zur Aktivitätsbestimmung. Die sauer reagierende Lösung mußte auf ein pH von 7,4 titriert werden. Die Substratkonzentration betrug 10^{-3} M/l ACh entsprechend der Zugabe von 0,1 ml der 5×10^{-2} molaren Stammlösung in einem Endvolumen von 2,0 ml.

Die Prüfung der Reaktivierbarkeit in vitro erfolgte durch 2-stündige Inkubation des Hämolysates mit 5×10^{-4} M/l Obidoxim bei Raumtemperatur.

2. Aufarbeitung und Aktivitätsbestimmung von Gewebeproben

Die Angaben der Esteraseaktivität von Gewebeproben beziehen sich auf Milligramm Frischgewicht. Ein Gewichtsteil Gehirn oder Muskel wurde mit neun Volumenteilen 0,9 %iger NaCl-Lösung zu zehnprozentigem Homogenat (g/v) verarbeitet. Je nach Aktivität wurden 0,1, 0,2, 0,5 oder 1 ml zur Messung notwendig. Da der pH-Wert des Homogenates unter 7,4 lag, mußte dieser durch Zugabe von Lauge eingestellt werden.

Vor dem Zusatz von Substrat wurde die unspezifische Säurefreisetzung gemessen, die von der durch Hydrolyse des ACh's herrührenden abgezogen werden mußte.

Die Prüfung der Reaktivierbarkeit gehemmter Esterase im Muskelgewebe erfolgte mit 10^{-4} M/l Obidoxim. Die Inkubationsdauer betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur

Nach längerer Inkubationszeit trat allmählich ein Aktivitätsverlust ein. Im Gegensatz dazu war die Esterase im Hirnhomogenat über 24 Stunden haltbar.

Reaktivierungsansätze mit Hirnhomogenat enthielten 10^{-3} M/l Obidoxim für zwei Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur.

3. Ablauf der Versuche beim Hund

Am Morgen des Versuchstages wurde Blut zur Kontrolle der Esteraseaktivität abgenommen. Bis zum Versuchsbeginn am Abend erhielt das Tier kein Futter. Die letzte Fütterung war am Vortag erfolgt. Zur Beruhigung wurde eine Stunde vor

der Eingabe von E 605^R durch die Schlundsonde 0,2 mg/kg Ponsital^R intramuskulär gegeben. Nach Einfließen der E 605^R-Lösung wurde die Schlundsonde mit Wasser nachgespült. Unmittelbar danach erhielt der Hund 1 mg/kg Atropin subkutan gespritzt.

Die erste Blutprobe wurde eine Stunde später entnommen, die zweite nach 14 Stunden. Im Anschluß daran erhielten die Tiere 20 ml Kochsalzlösung langsam i.v. injiziert. In dieser Lösung war bei den Tieren, die für eine Antidotbehandlung vorgesehen waren, die notwendige Dosis von Obidoxim gelöst.

In der Regel wurden während der ersten zwei Stunden nach der Obidoximgabe drei Blutabnahmen vorgenommen.

4. Gewinnung von Gewebeproben

Die Tiere wurden in Urethannarkose durch Punktion der Aorta entblutet. Danach erfolgte die Entnahme von Gewebematerial aus dem M.rectus abdominis, aus dem Zwerchfell und von der Herzspitze. Bis zum Homogenisieren und der anschließenden Messung der Esteraseaktivität befanden sich die Gewebeproben in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur.

Dann wurden der Schädel kreisförmig aufgesägt, die Bögen des ersten und zweiten Halswirbels abgebrochen und das Großhirn, das Kleinhirn und die Medulla oblongata entnommen. Die Sektion des Gehirns erfolgte auf einer eiskühlten Unterlage. Die N.caudati, die N.lentiformes und die Thalamus wurden jeweils aus beiden Hemisphären herauspräpariert, Rindengewebe konnte durch tangentielle Abtragung dünner Schnitte gewonnen werden. Kleinhirn und Medulla oblongata wurden voneinander getrennt, jedoch nicht weiter unterteilt verwendet.

C. Ergebnisse

I. Untersuchungen zur Ermittlung optimaler Bedingungen zur Esterasebestimmung

Die höchste Aktivität der Plasmaesterase ist bei pH 7 bis 7,4 zu messen (Abb. 1). In Wasser ist Azetylcholin bis pH 8 relativ haltbar, bei höheren pH-Werten zerfällt es, wie Abb. 2 zeigt, zunehmend.

Das Ausmaß der Spontanhydrolyse von Azetylcholin in den zu messenden Lösungen mit Plasma läßt sich ermitteln, wenn die Hydrolyserate gegen die eingesetzte Plasmaverdünnung aufgetragen wird (Abb. 3). Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse ("x" in Abb. 3) läßt sich die nicht enzymatische Hydrolyse ablesen.

Zu dem gleichen Zweck wurde die Azetylcholinhydrolyse in Plasmalösungen verschiedener Verdünnungen gemessen, in denen die Cholinesterase durch 10^{-3} M/l Neostigmin vollständig gehemmt war. Das Ergebnis, das in Tab. 1 dargestellt ist, bestätigt den im vorangegangenen Versuch ermittelten Wert für die nicht enzymatische Hydrolyse von ca. 20 nMol/min. Da bei höheren Plasmakonzentrationen keine Säurefreisetzung gemessen wurde, war zu prüfen, ob eine merkliche Retention von Säure auftritt. Tab. 2 zeigt, daß die Esteraseaktivität bei stärkerer Verdünnung des Plasmas zunimmt, in den höher konzentrierten Lösungen also Säure gebunden wird.

Im Hämolysat der Erythrozyten wurde ebenfalls die nicht enzymatische Hydrolyse von Azetylcholin nach Hemmung der Esterase überprüft. In zwei-, fünf- und zehnprozentigen Lösungen war keine Spontanhydrolyse meßbar.

Plasmakonzentr. %	gespaltenes ACh nMol/min
50	-
20	-
10	-
5	-
2	12,8
1	18,0
0,5	19,5
0	20,8

Tab. 1: Hydrolyse von ACh (10^{-2} M/l) in Plasma-
verdünnungen, in denen die Esterase durch
Zusatz von 10^{-3} M/l Neostigmin vollständ-
ig gehemmt war.
Hervorgehobener Teil: nicht enzymatische
Hydrolyse

Plasmakonzentr. %	Aktivität /uMol/ml/min	
50	2,28	2,2
20	2,34	2,36
10	3,0	3,07
5	3,0	3,08
2	3,12	3,16
1	3,24	3,22
0,5	3,34	3,4

Tab. 2: Messung der ChE-Aktivität in verschiede-
nen Plasmaverdünnungen (Doppelbestimmungen).
Hervorgehobener Teil: In Versuchen verwen-
dete Plasmalösungen.

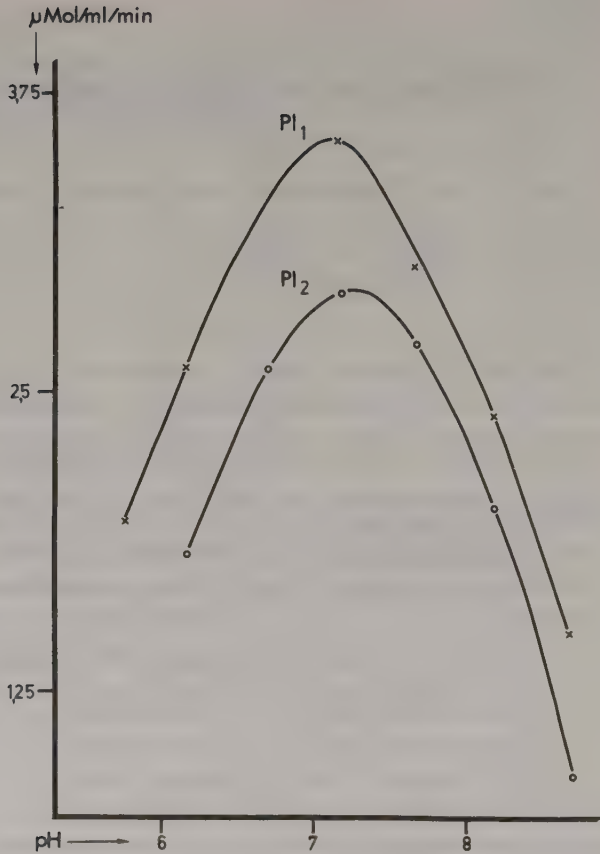


Abb. 1: Darstellung der ChE-Aktivität in Plasma gemessen bei verschiedenen pH-Werten; die Maxima liegen zwischen pH 7 bis 7,4

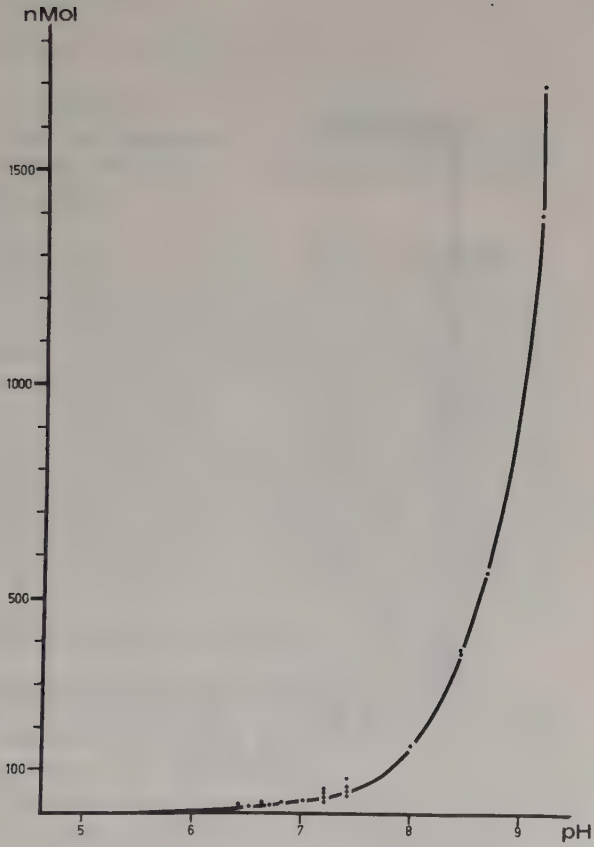


Abb. 2: Messung der Spontanhydrolyse von ACh
(10⁻² M/l) in Wasser. Oberhalb von pH 8
zerfällt die Substanz relativ schnell

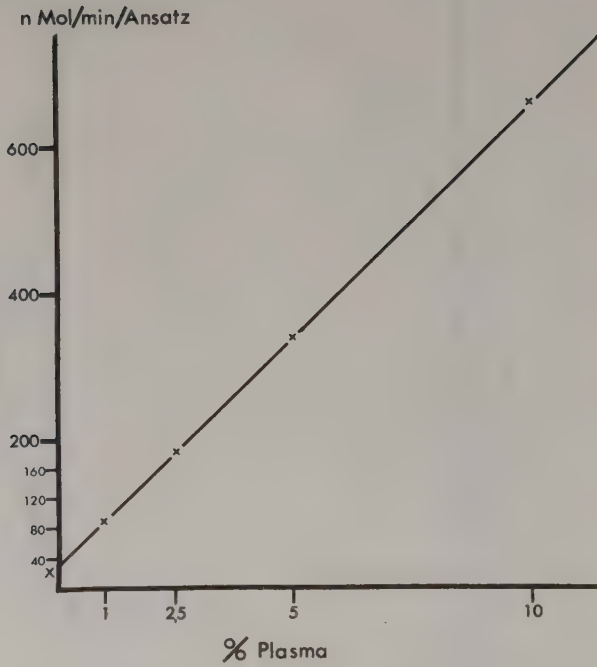


Abb. 3: Darstellung der ChE-Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmakonzentration (ACh 2×10^{-2} M/l, pH 7,4)
x = 0: nicht enzymat. Hydrolyse

II. In vitro-Versuche

1.a. Hemmung von Plasmacholinesterase

Für in vitro-Versuche ist Parathion nicht brauchbar, da es kein Hemmstoff der Cholinesterase ist. Deshalb wurde für die in vitro-Experimente Para-oxon verwendet.

Die Kurven in Abb. 4 zeigen, daß die Hemmung von der Konzentration des Hemmstoffes und von dessen Einwirkungszeit abhängig ist. Bei 10^{-8} M/l Para-oxon tritt im Laufe von sechs Stunden nur eine Hemmung von 15 % ein, bei 10^{-7} M/l werden in drei Stunden 90 % gehemmt und bei 10^{-6} M/l ist derselbe Effekt schon nach 15 min erreicht. Halbologarithmisch aufgetragen ergibt sich keine gradlinige Beziehung, sondern am Anfang ein steiler, später ein flacherer Abfall. Stärke und Verlauf der Hemmung wich im Plasma verschiedener Individuen nur wenig voneinander ab.

1.b. Reaktivierung von Plasmacholinesterase

Aus den Kurven in den Abb. 5 und 6 geht hervor, daß P1ChE, die durch 10^{-7} oder 5×10^{-8} M/l Para-oxon vollständig gehemmt war, durch 10^{-3} M/l 2-PAM oder Obidoxim in identischem zeitlichen Verlauf innerhalb von ca. zwei Stunden wieder reaktiviert werden kann. Das gelingt jedoch nur während der ersten Stunden nach Eintritt der Hemmung. Je länger sie anhält, um so schlechter wird die Reaktivierbarkeit. Aus den Kurven der Abb. 7 ist zu ersehen, daß nach zwei Tagen nur noch eine geringfügige Reaktivierung zu erreichen ist.

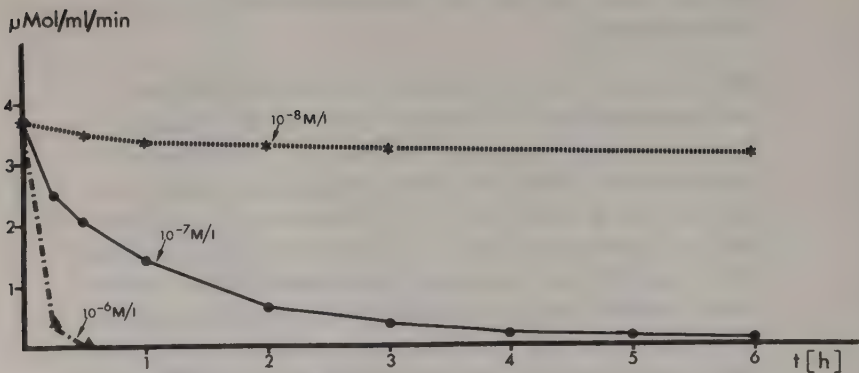


Abb. 4: ChE-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit. Mit der Zeit und der Paraoxonkonzentration (3 Beispiele) nimmt die Hemmung der PlChE zu. (Messung in 10 %iger Lösung der gehemmten Ansätze, Humanblut)

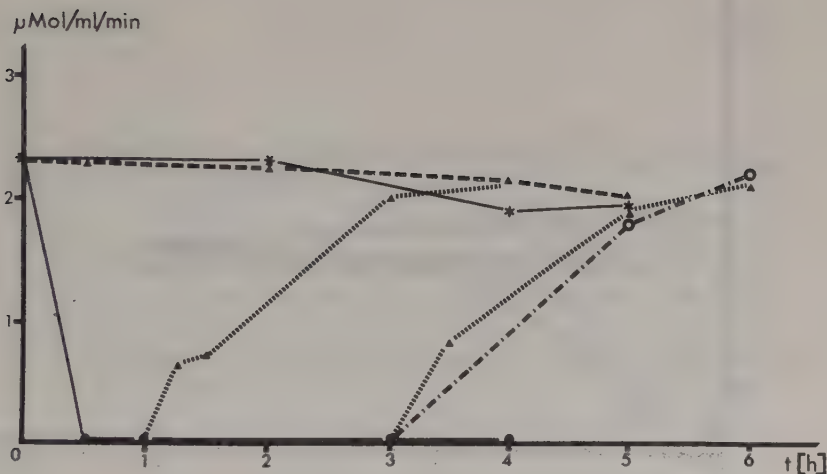


Abb. 5: Reaktivierung von PLChE durch Obidoxim und 2-PAM.

- * — * Kontrolle (20 % Plasmalösung, Humanblut)
- ▲ ---- ▲ Plasma + Reaktivator Obidoxim 10^{-3} M/l
- — ● " + Hemmstoff Paraoxon 5×10^{-8} M/l
- ▲ / / / / ▲ " + " + Obidoxim 10^{-3} M/l
- - . - . - ○ " + " + 2-PAM 10^{-3} M/l

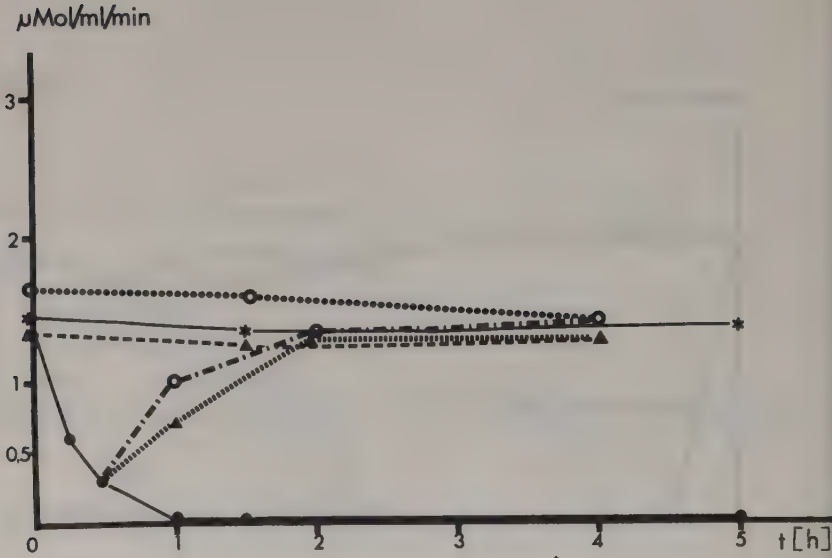


Abb. 6: Reaktivierung von P1ChE durch Obidoxim und 2-PAM

■ — *	Kontrolle (20 % Plasmalösung, Humanblut)			
▲ --- ▲	Plasma + Reaktivator	Obidoxim	10^{-3} M/l	
○ ○	Plasma + Reaktivator	2-PAM	10^{-3} M/l	
● — ●	Plasma + Hemmstoff	Paraoxon	10^{-7} M/l	
▲ / / / ▲	" + "	+ Obidoxim	10^{-3} M/l	
○ - - - ○	" + "	+ 2-PAM	10^{-3} M/l	

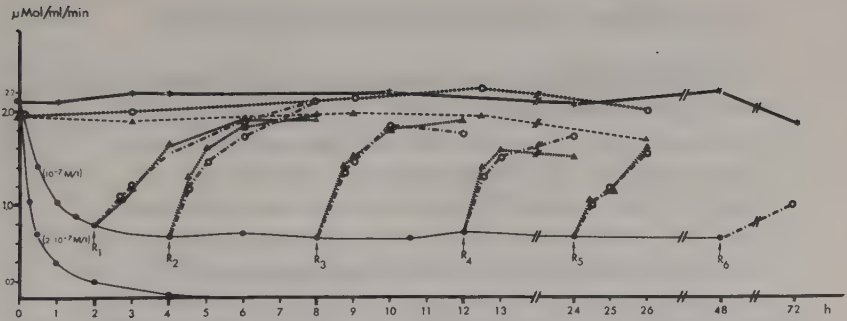


Abb. 7: Reaktivierungsversuche von P1ChE durch Obidoxim
und 2-PAM über einen Zeitraum von 72 h (Humanblut)
Kurvensymbole wie in Abb. 6

In der Wirkungsstärke unterscheiden sich die beiden Reaktivatorstoffe nicht, obwohl Obidoxim pro Mol zwei Aldoxim-Gruppen besitzt, die als Wirkgruppen angesehen werden müssen.

Mit 10^{-4} molarer Reaktivatorkonzentration wurde keine Reaktivierung erreicht (Abb. 8).

2.a. Hemmung von Erythrozyten-AChE in Hämolysat

In 20 %igem Hämolysat erwies sich die Erythrozyten-esterase - eine AChE wie sie auch im Nervensystem vorkommt - als ca. fünf mal so empfindlich gegenüber Paraaxon wie Plasmaesterase. Die Kurven in Abb. 9 zeigen, daß Paraaxon in der Konzentration von 10^{-8} M/l nach vier Stunden bereits 65 % der Esterase hemmt und die doppelte Konzentration in der gleichen Zeit zur vollständigen Hemmung führt. Der Abstand zwischen minimal und maximal wirksamer Konzentration muß demnach gering sein. Eine stärkere Variation war bei Blutproben, die von verschiedenen Personen stammten, nicht festzustellen.

2.b. Reaktivierung der Erythrozyten-AChE im Hämolysat

Für Reaktivierungsversuche wurde Hämolysat mit 2×10^{-8} M/l Paraaxon versetzt. Nach einer Stunde waren 50 % der Esterase gehemmt, nach zwei Stunden 80 %, nach drei Stunden 90 % und nach vier Stunden 95 %. Nach 10 Stunden betrug die Enzymaktivität zwischen 0,1 und 0,2 % der Ausgangsaktivität. Im Hämolysat verläuft die Hemmung demnach wie eine Reaktion 1. Ordnung.

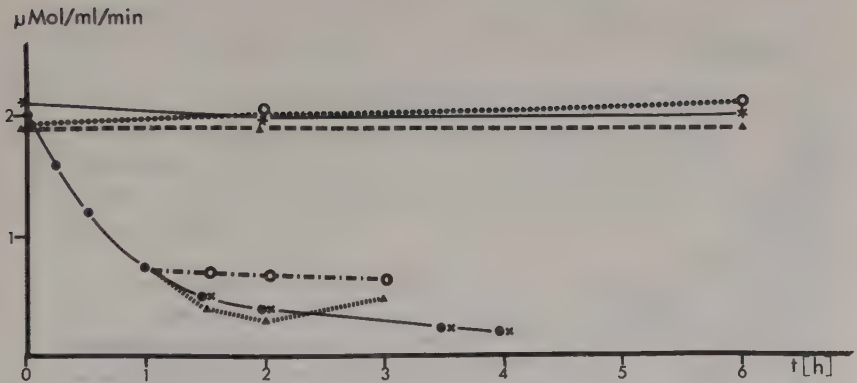


Abb. 8: Reaktivierungsversuch von P1ChE mit Obidoxim und 2-PAM (Humanblut)
Kurvensymbole wie in Abb. 6.
Hemmung wie zuvor mit Paraoxon 10^{-7} M/l,
Reaktivierung jedoch mit Obidoxim und 2-PAM 10^{-4} M/l

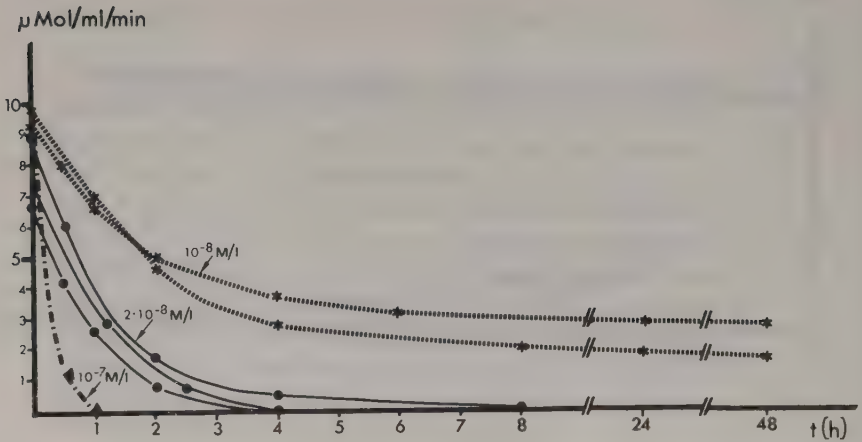


Abb. 9: Hemmung von Erythrozyten-AChE in 20 %igem Hämolysat in Abhängigkeit von der Zeit mit 3 verschiedenen Paraoxonkonzentrationen: 10^{-8} M/l (2 Beispiele), $2 \times 10^{-8} \text{ M/l}$ (3 Beispiele), 10^{-7} M/l (1 Beispiel)

Die Reaktivierung erfolgt erheblich schneller als im Plasma und benötigt eine geringere Konzentration: Mit $0,5 \times 10^{-3}$ M/l Oxim, d.h. der Hälfte dessen, was im Plasma für eine vollständige Reaktivierung im Laufe von zwei Stunden notwendig ist, tritt in weniger als 30 Minuten 100 % Wiederherstellung der Enzymaktivität ein. Abb. 10 zeigt, daß dieser Effekt in den ersten 24 Stunden nach Zugabe von Hemmstoff nicht nachgelassen hat.

Für einen weiteren Versuch wurde die Reaktivator-konzentration auf 10^{-4} M/l herabgesetzt. In dieser Meßreihe konnte die schrittweise Abnahme der Reaktivierbarkeit der Azetylcholinesterase in der Zeit verfolgt werden (Abb. 11).

Die gemessenen Aktivitätswerte sind in folgender Tabelle zusammengestellt, der Maximalwert ist besonders hervorgehoben:

h nach Paraoxon	Aktivität in $\mu\text{Mol/min}$ nach h Inkubation			
	1/2	1	2	6
1	10,6	10,0	10,0	-
2	9,4	10,3	10,3	-
4	9,1	10,3	10,3	-
6	8,9	9,4	10,0	-
10	9,6	10,1	10,0	-
14	8,1	8,5	9,9	-
24	7,7	8,4	9,0	9,5
30	7,3	8,0	8,0	8,1
36	-	-	6,8	7,4
48	5,3	5,5	6,7	7,0

Tab.: 3 Aktivität der AChE in 20 %igem Hämolyat nach Hemmung mit Paraoxon (2×10^{-8} M/l) und Reaktivierung mit Obidoxim (10^{-4} M/l)

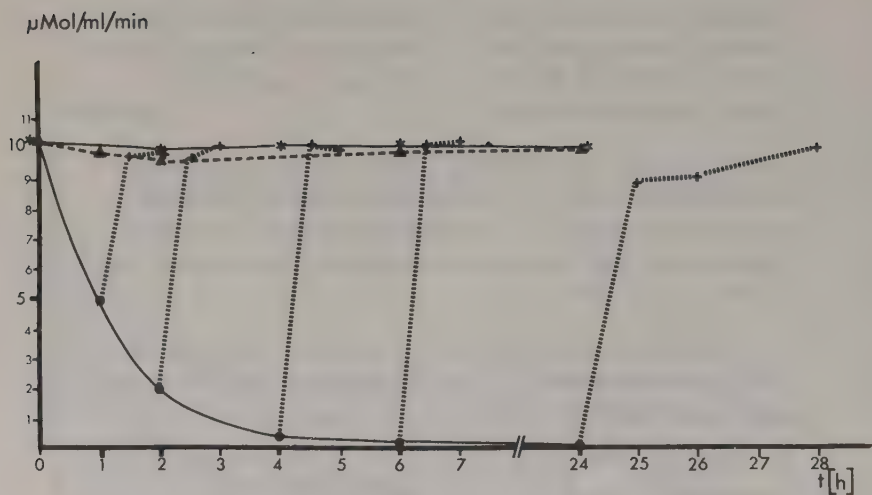


Abb. 10: Reaktivierungsversuche von Ery-AChE in Hämolysat über einen Zeitraum von 24 Std. nach Hemmstoffzugabe (Humanblut)

- * — * Kontrolle (20 %iges Hämolysat)
- ▲ ---- ▲ " + Obidoxim 5×10^{-4} M/l
- — ● Hämolysat + Hemmstoff Paraoxon 2×10^{-8} M/l
- + + " + " + Obidoxim 5×10^{-4} M/l

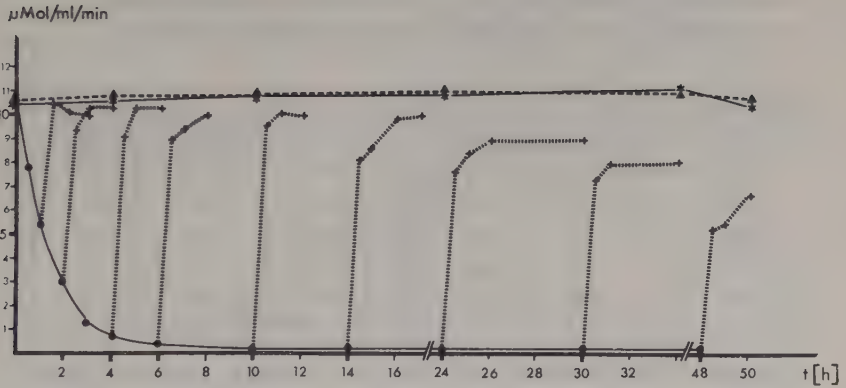


Abb. 11: Reaktivierungsversuche von Ery-AChE in 20 %igem Hämolyrat über einen Zeitraum von 48 Std. nach Hemmstoffzugabe. Kurvensymbole und Hemmstoffkonzentration wie in Abb. 10, jedoch Reaktivierung mit Obidoxim 10^{-4} M/l

Die Abhängigkeit der Reaktivierung von der Konzentration an Obidoxim und 2-PAM ist in der Tab. 4 und in den Abb. 12 und 13 dargestellt. Die Reaktivatoren wurden 24 bzw. 16 Stunden nach Zugabe des Hemmstoffes zugesetzt. Obidoxim erwies sich als etwa doppelt so wirksam wie 2-PAM. An der Plasmaesterase waren beide Reaktivatoren ungefähr gleich wirksam, hier dagegen an der Erythrozytenesterase findet sich entsprechend der doppelten Zahl von Oximgruppen auch eine zweifach stärkere Wirkung.

Reaktivator Konzentrat. M/l	Reaktivierg.in%*		Reaktivator Konzentrat. M/l	Reaktivierg.in%**	
	Obidoxim	2-PAM		Obidoxim	2-PAM
10^{-4}	75	55	$0,1 \times 10^{-4}$	40	20
$0,5 \times 10^{-4}$	60	45	$0,05 \times 10^{-4}$	30	12
$0,2 \times 10^{-4}$	50	30	$0,02 \times 10^{-4}$	20	9
$0,1 \times 10^{-4}$	30	25	$0,01 \times 10^{-4}$	10	2,5

Tab.:4: Reaktivierung der AChE in 20 %igem Hämolysat nach Hemmung mit 2×10^{-8} M/l Paraoxon und Reaktivierung mit verschiedenen Konzentrationen Obidoxim und 2-PAM.
 *% Reaktivierung = $100 \times \frac{\text{Aktivität 1 h n.Reakt.-24h n.H.}}{\text{Aktivität vor Hemm.-24h n.H.}}$
 ** ebenso, jedoch 16 h statt 24 h

Zur Reaktivierung ist nach diesen Ergebnissen ein mindestens 100-facher Überschuß der Reaktivatormoleküle gegenüber den Hemmstoffmolekülen notwendig, aber erst bei 1000-fachem Überschuß tritt die Reaktivierung schnell und vollständig ein. Somit muß 10^{-5} M/l Obidoxim als die Konzentration betrachtet werden, die an den Wirkorten im Organismus möglichst erreicht werden sollte.

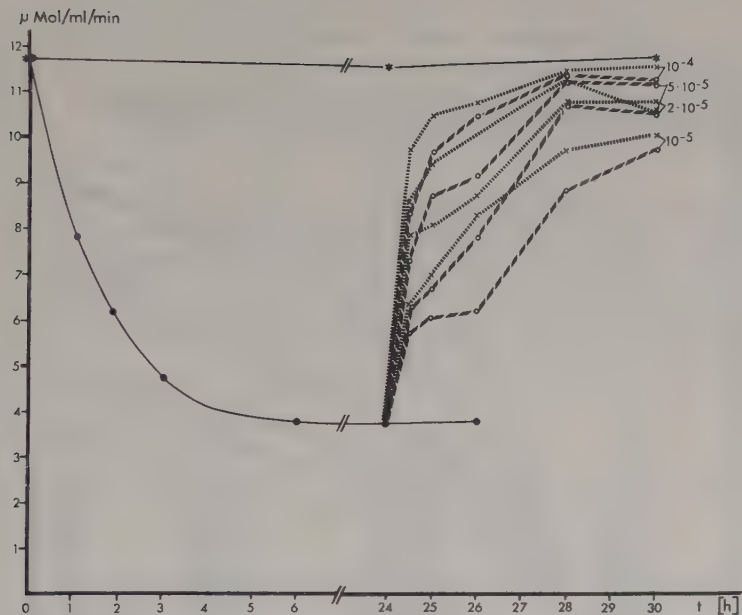


Abb. 12: Abhängigkeit der Reaktivierung gehemmter Ery-AChE von der Konzentration des Reaktivators $10^{-4} - 10^{-5}$ M/l (Zugabe nach 24 stdg. Hemmzeit, Humanblut)

* — * Kontrolle (20 %iges Hämolyrat)
 . — . Hämolyrat + Hemmstoff Paraoxon 2×10^{-8} M/l
 x ' ' ' x " + " # Obidoxim
 0 // // 0 " + " + 2-PAM
 (Reaktivator Konzentrat. an den Kurven)

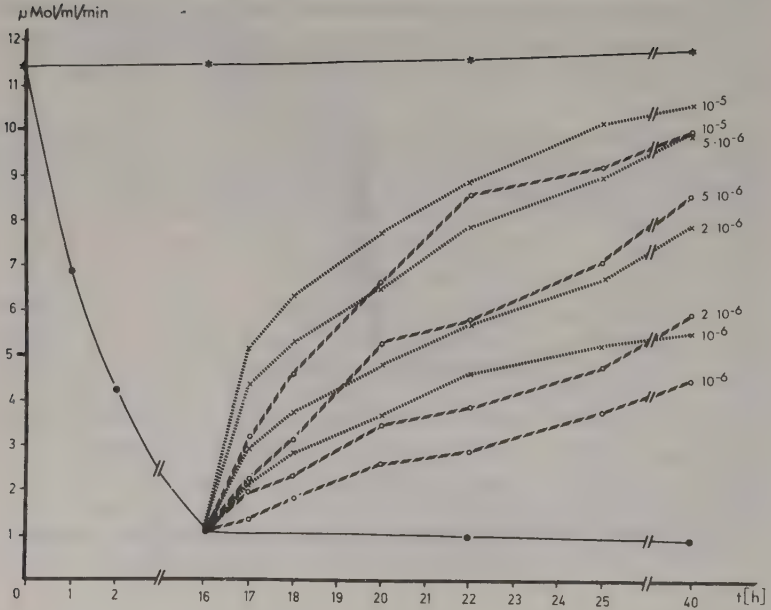
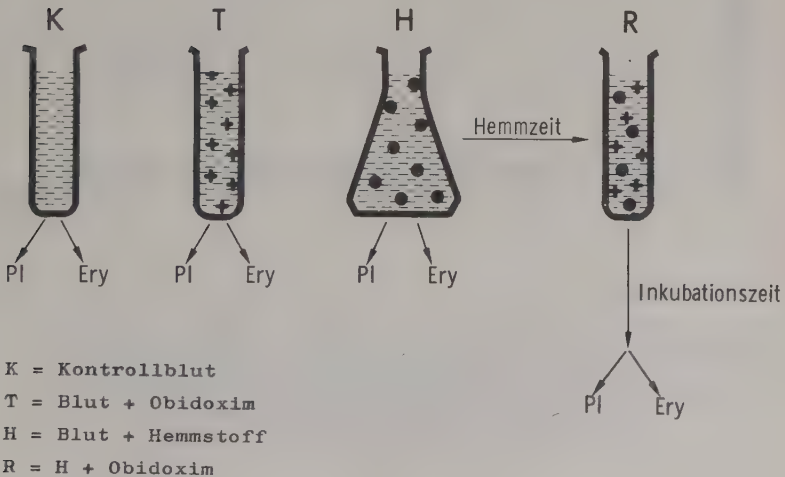


Abb. 13: Abhängigkeit der Reaktivierung gehemmter Ery-AChE von der Konzentration des Reaktivators: 10^{-5} - 10^{-6} M/l (Zugabe nach 16-stündiger Hemmzeit). Kurvensymbole und Hemmstoffkonzentration wie in Abb. 12

Zu prüfen war, ob diese Konzentration etwa selbst eine Enzymhemmung bewirkte. Wie aus Abb. 14 hervorgeht, kommt es erst bei 10^{-3} M/l zu einer Hemmung der Azetylcholinesterase von ca. 20 %. Durch Ausdehnung der Einwirkungszeit bis zu 24 Stunden Dauer wird der hemmende Effekt nicht verstärkt.

3. Hemmung und Reaktivierung der Azetylcholinesterase intakter Erythrozyten im Blut in vitro

Das folgende Schema zeigt, welche Probansätze parallel untersucht wurden. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 veranschaulicht. Für jede Messung wurden zwei Milliliter entnommen, Plasma und Erythrozyten voneinander getrennt und in beiden einzeln die Enzymaktivität bestimmt.



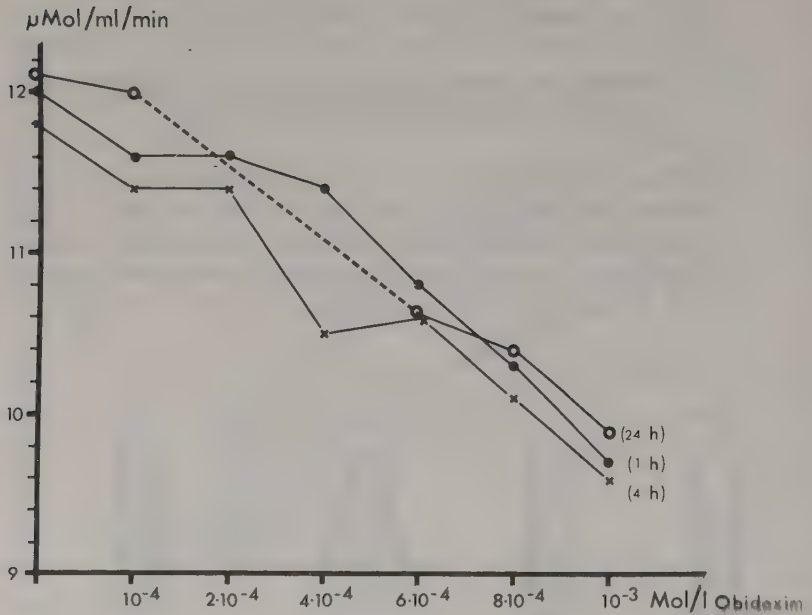


Abb. 14: Prüfung des Einflusses von Reaktivator auf die Enzymaktivität der AChE in 20 %igem HämolySAT bei 6 verschiedenen Konzentrationen und 3 Einwirkungszeiten (Humanblut)

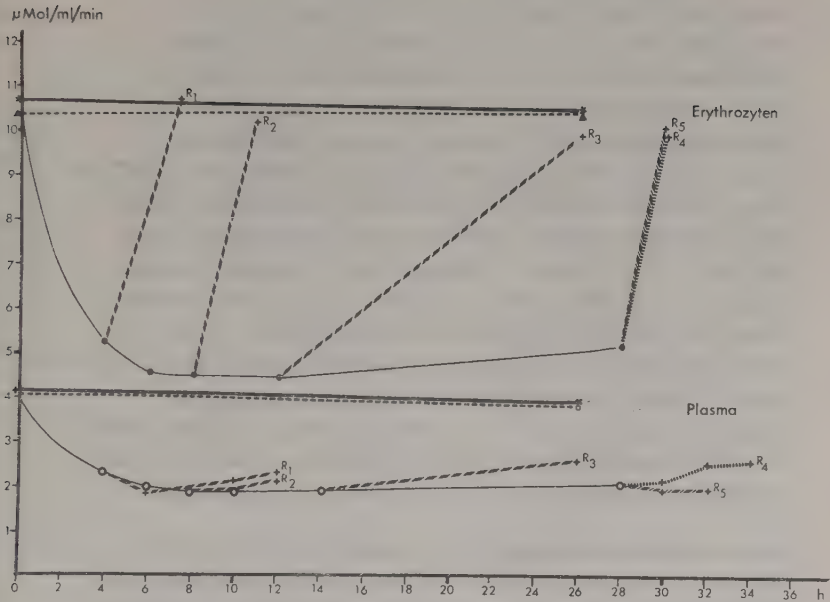


Abb. 15: Reaktivierungsversuche der 5×10^{-8} M/l Paraoxon gehemmten AChE intakter Erythrozyten über einen Zeitraum von 28 Std. nach Hemmstoffzugabe.

Zum Vergleich in dem unteren Teil der Abb. die Verhältnisse bei der PlChE (Humanblut)

Ery	Pl	
* ——— *	+ ——— +	Kontrollen
▲ ——— ▲	○ ——— ○	" + Reaktivat. Obid. 5×10^{-4} M/l
● ——— ●	○ ——— ○	gehemmte Ansätze Paraoxon
+ //// +		$R_1 - R_3$: Obidoxim 10^{-4} M/l
+ ' ' ' +		R_4 : " 10^{-3} M/l
+ /././+		R_5 : " 10^{-5} M/l

Die Hemmstoffkonzentration in "H" und "R" betrug 5×10^{-8} M/l Paraaxon, die im Laufe von sechs bis acht Stunden zu einer Hemmung von 50 % der Esteraseaktivität in den Erythrozyten und auch im Plasma führte. In diesem Fall waren somit beide Esterasen gegenüber Paraaxon gleich empfindlich. Deutliche Unterschiede ergaben sich jedoch bei der Reaktivierung. Die Erythrozytenesterase wurde durch 10^{-4} M/l Obidoxim in zwei Stunden vollständig reaktiviert, und selbst 28 Stunden nach Hemmstoffzugabe bewirkten 10^{-5} M/l Obidoxim noch eine Wiederherstellung von 95 % der Enzymaktivität. Dagegen war Obidoxim an der PlChE sehr wenig wirksam. 10^{-4} M/l brachten eine Reaktivierung von zehn Prozent in vier Stunden und 10^{-3} M/l, 28 Stunden nach Hemmstoffzugabe, reaktivierten in sechs Stunden etwa 20 % der gehemmten Esterase.

Um die Reaktivierbarkeit der gehemmten AChE in den Erythrozyten quantitativ mit den Resultaten der Versuche mit Hämolysat, also gelöster Esterase, vergleichen zu können, mußten noch geringere Konzentrationen ausgetestet werden. Aus den Kurven der Abb. 16 geht hervor, daß Obidoxim auf die in den Zellen befindliche Esterase bis zu einer Reaktivatorkonzentration von 10^{-6} M/l genauso gut wirkt wie in der Lösung (vgl. Abb. 12 und 13).

4. Hemmung und Reaktivierung der Cholinesterasen in Plasma und Erythrozyten im Blut von Hunden

Da die vorzunehmenden Intoxikationsversuche am Hund durchgeführt werden sollten, mußten die vorangegangenen in vitro-Untersuchungen mit Hundeblut wiederholt werden. Dazu wurden jedem von vier Hunden 20 Milliliter Blut entnommen.

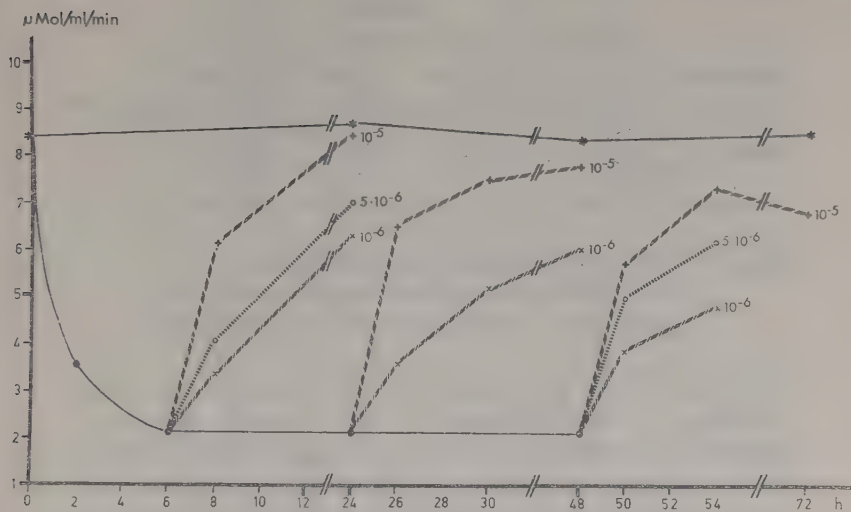


Abb. 16: Reaktivierungsversuche der mit 10^{-7} M/l Paraoxon gehemmten AChE intakter Erythrozyten über einen Zeitraum von 48 Std. nach Hemmstoffzugabe beim Hund. Kurvensymbole für Kontrolle und gehemmte Ansätze wie in Abb. 15. Kurven für reaktivierte Proben jeweils mit Konzentrationsangaben.

In der folgenden Tabelle sind die angewendeten Konzentrationen von Paraoxon und Obidoxim angegeben:

		Versuch			
		1	2	3	4
Paraoxon	Pl	10^{-6}	5×10^{-7}	10^{-6}	2×10^{-6}
	Ery	2×10^{-8}			
Obidoxim	Pl	5×10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
	Ery			10^{-4}	10^{-4}

Tab. 5: Übersicht über die in vier in vitro-Versuchen zur Hemmung und Reaktivierung verwendeten molaren Wirkstoffkonzentrationen

In Versuch 1) wurden Plasma und Erythrozyten getrennt behandelt, in den Versuchen 2) bis 4) wurden die Reaktionen in Vollblut durchgeführt. Die Bestimmungen dieser Ansätze erfolgten nach Trennung von Plasma und Erythrozyten zu jedem Zeitpunkt der Probeentnahme.

Versuch 1), Abb. 17:

Nach ungenügender Hemmung durch 10^{-7} M/l und 2×10^{-7} M/l Paraoxon wurde mit 10^{-6} molarer Konzentration im Plasma (unteres Diagramm) nach sechs Stunden eine Hemmung von 90 % erreicht. In 20 %igem Erythrozytenhämolysat (oberes Diagramm) fiel die Aktivität mit 2×10^{-8} M/l Paraoxon nach vier Stunden auf 20 %, nach sechs Stunden auf 13 % ab. Die Reaktivierung gelang im Plasma mit 5×10^{-4} M/l Obidoxim nach zwei Stunden zu 50 %, nach 24 Stunden zu 80 %.

Im Erythrozytenhämolysat war zwei Stunden nach Zugabe von 5×10^{-4} M/l Obidoxim die Ausgangsaktivität wieder erreicht, die Hemmung somit vollständig aufgehoben.

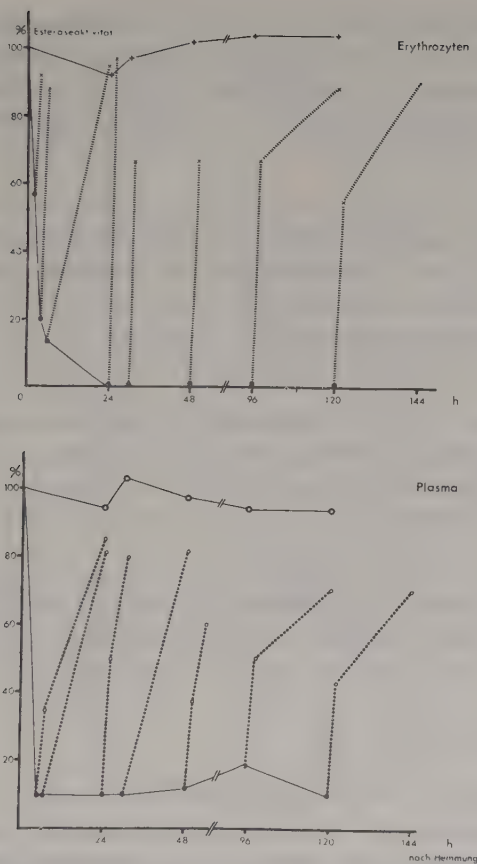


Abb. 17: Getrennte Reaktivierungsversuche im Plasma (unteres Diagramm) und Hämolysat.

Erythrozyten (oberes Diagramm) beim Hund.

Ery	Pl	
+ — +	o — o	Kontrollen
. — .		Paraoxon-gehemmte Ansätze
x ' ' ' x	o o	mit Reaktivator Obidoxim
		5×10^{-4} M/l inkubierte Ansätze

Ery 2×10^{-8} M/l
 Pl 10^{-6} M/l

Die Reaktivierbarkeit war zwei Stunden und 24 Stunden nach Beginn der Hemmung gleich gut. 48 Stunden nach Zugabe des Hemmstoffes reicht die zweistündige Einwirkung von Obidoxim nicht zur vollen Reaktivierung aus.

Die Plasmaesterase des Hundes ist diesem Ergebnis zufolge gegenüber Paraoxon erheblich weniger empfindlich als die Plasmaesterase des Menschen. Für eine gleich starke Hemmung wird eine zehnfach höhere Konzentration - nämlich 10^{-6} M/l statt 10^{-7} M/l - benötigt. Ähnlich verhielt es sich bei der Reaktivierung.

Mit 5×10^{-4} M/l Obidoxim wurden nach zwei Stunden nur 50 %, nach 24 Stunden nur 80 % Aktivität wiedererlangt, während im Humanplasma volle Reaktivierung erreicht worden war.

Die Azetylcholinesterase-Aktivität ist in menschlichen Erythrozyten etwa zehnmal so hoch wie beim Hund, aber die hemmende Wirkung von Paraoxon und die reaktivierende von Obidoxim sind bei beiden Spezies etwa gleich.

Versuch 2), Abb. 18:

Die Paraoxonkonzentration von 5×10^{-7} M/l, die für die Versuche mit Vollblut gewählt wurde, lag zwischen den in Plasma und Hämolytat voll wirksam gefundenen. Sie hatte sowohl für die Plasma- als auch für die Erythrozytenesterase einen etwa 50 %igen Aktivitätsverlust zur Folge. Der gleiche Effekt war im menschlichen Vollblut mit 5×10^{-8} M/l erreicht worden (vgl. Abb. 15). Im Vergleich zu Versuch 1) war eine wesentlich höhere Restaktivität verblieben - 50 % gegenüber 10 % - daher ließ sich im Plasma die volle Ausgangs-

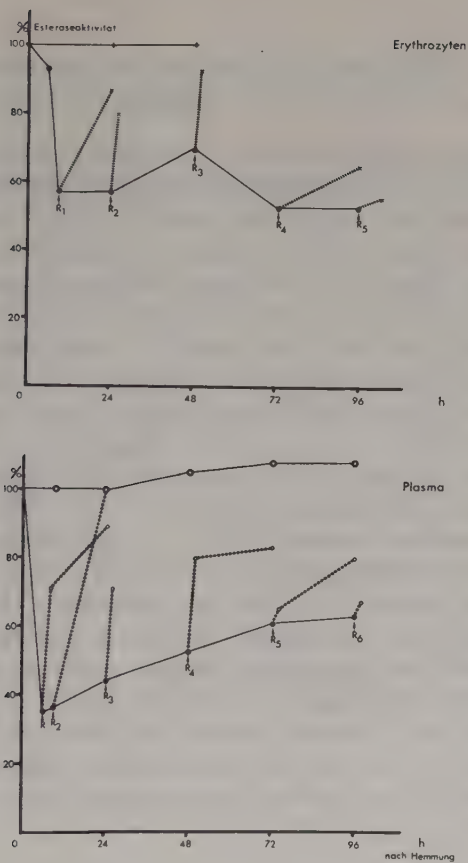


Abb. 18: Reaktivierungsversuche von PlChE und Ery AChE nach Hemmung mit 5×10^{-7} M/l Paraoxon in Vollblut beim Hund. Meßergebnisse für Pl u. Ery in getrennten Diagrammen, Symbole wie in Abb. 17. Reaktivatorkonzentration: 10^{-3} M/l Obidoxim

aktivität wiederherstellen. In den Erythrozyten wurden maximal 90 % - gegenüber 100 % - reaktiviert.

Diese Differenz konnte auf eine unterschiedliche Verteilung des Reaktivators zwischen Plasma und Erythrozyten im Vollblut zurückzuführen sein: Es konnte eine zu hohe, hemmende Oximkonzentration vorliegen (vgl. Abb. 14), oder eine ungenügende Konzentration für den intakten Erythrozyten im Vergleich zum Hämolysat verfügbar sein. Um beide Möglichkeiten zu prüfen, sollte in den folgenden Versuchen zunächst die Reaktivierung in gehemmttem Vollblut gemessen werden (Abb. 18 u. 19 als R bezeichnet). Danach sollte ein weiterer zusätzlicher Reaktivierungsversuch im Hämolysat (in Abb. 18 und 19 als T bezeichnet) unternommen werden. Im Falle einer Hemmung durch zu hohe Reaktivatorkonzentration (1. Möglichkeit) müßte der zweite unter dem ersten Meßwert liegen. Bei unvollständiger Reaktivierung (2. Möglichkeit) der Azetylcholinesterase im Blut müßte im Hämolysat durch die zusätzliche Inkubation die Ausgangsaktivität voll erreicht werden. Das Ergebnis zeigen die Abb. 19 und 20. Mit zusätzlicher Inkubation konnten die ersten Meßwerte um einige Prozent verbessert werden.

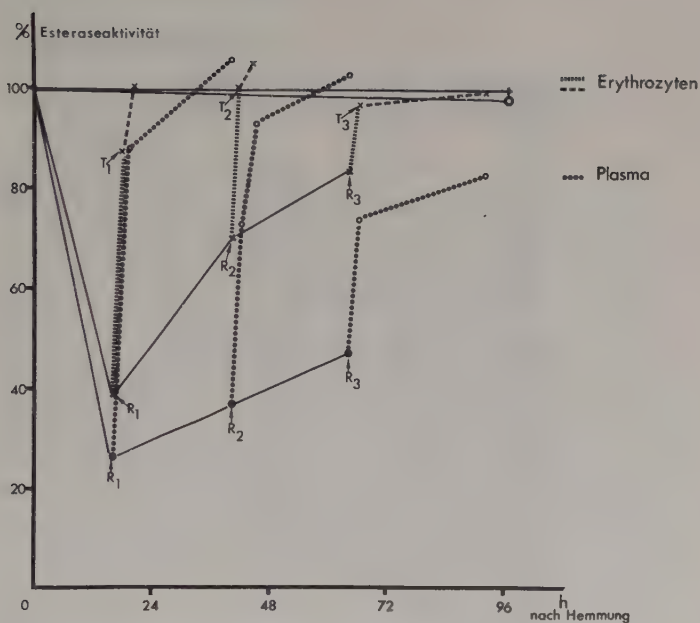


Abb. 19: Reaktivierungsversuche von Pl-ChE und Ery-AChE nach Hemmung mit 10^{-6} M/l Paraoxon in Vollblut beim Hund.

Symbole wie in Abb. 17.

Reaktivatorkonzentration: 10^{-3} M/l Obidoxim zum Vollblut (mit R und Pfeil bezeichnet)

Zusätzl. Inkubation im Hämolsat mit 10^{-4} M/l Obidoxim (mit T und Pfeil bezeichnet)

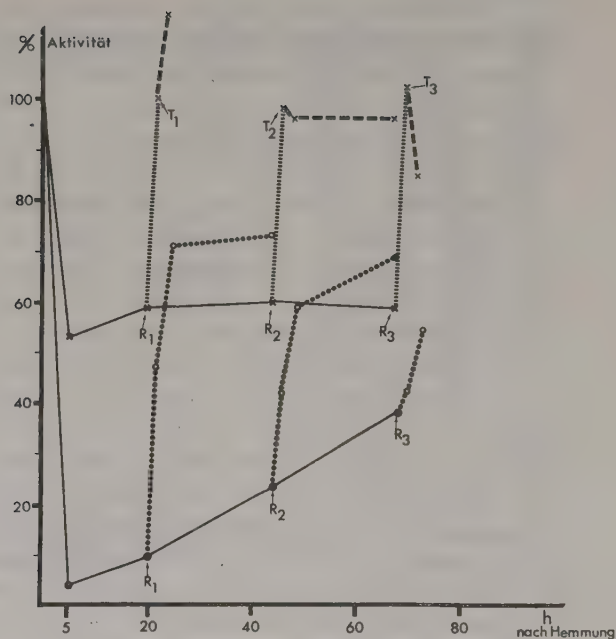


Abb. 20: Reaktivierungsversuche von PI-ChE und Ery-AChE wie Abb. 19, jedoch nach Hemmung mit 2×10^{-6} M/l Paraoxon in Vollblut. Reaktivatorkonzentration und Symbole wie in Abb. 19

III. In vivo-Untersuchungen

I. Versuche am Hund

1. Esteraseaktivität im Blut eines Parathionvergifteten Hundes vor und nach Anwendung von Obidoxim

Durch den ersten Versuch am Hund sollte ermittelt werden, welche Obidoxim-Dosen bei der Parathionvergiftung eine nachweisbare Reaktivierung der Cholinesterase des Plasmas und der Erythrozyten bewirkte, und bei welcher Dosis der maximale Effekt auftritt. Gleichzeitig war zu prüfen, ob die Reaktivierbarkeit des abgenommenen Blutes in vitro als Kriterium für den zu erwartenden therapeutischen Effekt verwendet werden könnte. Der zur Verfügung stehende Bastard wog 21,5 kg und war vier Jahre alt. Das Tier erhielt 5 mg/kg Parathion oral und danach Dosen von 1 mg bis 20 mg/kg Obidoxim. Der Versuch lief folgendermaßen ab:

Zeit

-3 bis -1 d	Bestimmung der Pl- und Ery-Esteraseaktivität an aufeinanderfolgenden Tagen vor dem Versuch
-12 h	Futter entzogen
-10 m	Blutentnahme zur Bestimmung der Esterasen
- 5 m	1 mg/kg Atropin s.c.
0	5 mg/kg Parathion in Gelatine kapsel, oral
2 h	1. Blutentnahme zur Esterasebestimmung. 1 mg/kg Obidoxim i.v.
3 h	2. Blutentnahme zur Esterasebestimmung. 10 mg/kg Obidoxim i.v.
4 h	3. Blutentnahme zur Esterasebestimmung. 10 mg/kg Obidoxim i.v.
6 h	4. Blutentnahme zur Esterasebestimmung.
24 h	5. Blutentnahme zur Esterasebestimmung. 20 mg/kg Obidoxim i.v.

25 h	6. Blutentnahme zur Esterasebestimmung.
48 h	7. Blutentnahme zur Esterasebestimmung. 20 mg/kg Obidoxim i.v.
49 h	8. Blutentnahme zur Esterasebestimmung.

Eine Stunde nach der Applikation von Parathion traten Speichelfluß, Exzitation und Erbrechen auf. Ein Teil der Dosis konnte dadurch verloren gegangen sein. Die Hemmung betrug zwei Stunden nach der Gabe des Alkylphosphates im Plasma 35 % und in den Erythrozyten 40 %.

Da bereits 2 Stunden nach Vergiftung mit der Antidottherapie begonnen wurde, ist die Hemmung der Esterasen nur wenig ausgeprägt. Nach 24 Stunden stieg die Aktivität in Plasma und Erythrozyten kontinuierlich an. Der Wert im Plasma 1 Stunde nach Obidoxim-Injektion lag jeweils etwas über dem vor der Gabe (Abb. 21).

Parallel zu dem Anstieg der Aktivität in vivo nahm die Reaktivierbarkeit in vitro ab (Abb. 21, 22); die Differenzkurven aus gehemmten zu reaktivierten Werten zeigen über 24 Stunden etwa ein Plateau und fallen dann ab. Für die Erythrozyten wurde vom dritten Tag an, für das Plasma vom fünften Tage an keine Anhebung des in vivo-Wertes mehr erreicht.

2. Esteraseaktivität in Blut, Muskel und Hirnrinde beim Hund nach Parathion-Vergiftung und Behandlung mit Obidoxim

Die lebensbedrohlichen Funktionsänderungen bei der Alkylphosphatvergiftung sind nicht durch die Hemmung

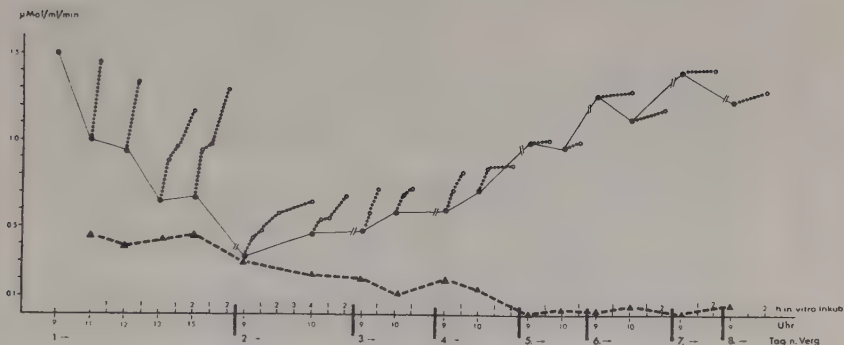


Abb. 21: Verlauf der Esteraseaktivität im Plasma beim Hund mit den jeweils in der Probe durch 2- bis 4-stündige Obidoximinkubation in vitro erreichten Werten:

- — ● im Plasma gemessene Aktivität
- ○ nach Reaktivierung in vitro gem. Aktivität
- ▲ ---- ▲ Differenzkurve aus gehemmten zu reaktivierten Aktivitätswerten

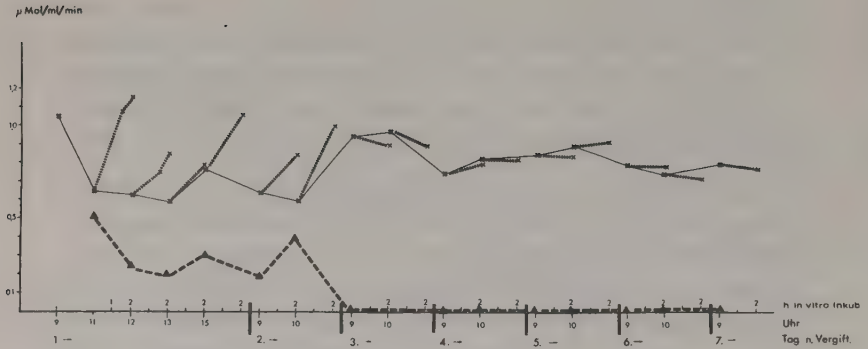


Abb. 22: Verlauf der Esteraseaktivität in Erythrozyten beim Hund mit den in der jeweiligen Probe durch 2-stündige Obidoximinkubation in vitro erreichten Werte:

- x — x in Erythrozyten gemessene Aktivität
- x - - - x nach Reaktivierung in vitro gem. Aktivität
- ▲ - - - ▲ Differenzkurve aus gehemmten zu reaktivierten Aktivitätswerten

der Cholinesterasen des Blutes bedingt, sondern durch die Blockade der Esterase in den Geweben, vornehmlich im Gehirn und in der Muskulatur. Deshalb sollte geprüft werden, ob es möglich ist, durch Injektion des Reaktivators Obidoxim die Hemmung der Cholinesterasen im Gehirn und in der Muskulatur rückgängig zu machen.

Bei der experimentellen Prüfung dieser Frage müssen einige Faktoren beachtet werden, die für die spätere Interpretation der Resultate von Bedeutung sind:

Erstens reagiert das Oxim nicht nur mit dem an das Enzym gebundenen sondern auch mit dem freien Alkylphosphat. Das heißt, eine geringere Hemmung der Cholinesterasen nach Antidotbehandlung könnte auch durch eine Verminderung der Konzentration des reaktionsfähigen freien Alkylphosphates zustande gekommen sein und nicht auf einer Ablösung der Phosphatmoleküle von der Esterase, also einer Reaktivierung beruhen. Diese Reaktion zwischen Reaktivator und Alkylphosphat spielt besonders deshalb eine Rolle, weil von dem Antidot soviel gegeben wird, daß es gegenüber dem Alkylphosphat in beträchtlichem Überschuß im Organismus vorliegt. Um diese Möglichkeit der Fehlinterpretation auszuschließen, darf der Reaktivator im Tierexperiment erst appliziert werden, nachdem die maximal mit der gegebenen Alkylphosphatdosis erreichbare Enzymhemmung eingetreten ist, d.h. die Wirkung ihren Höhepunkt überschritten hat. Die zu einem späteren Zeitpunkt bewirkte Aktivitätssteigerung kann dann als Enzymreaktivierung angesehen werden.

Die zweite Fehlerquelle, die auszuschalten ist, beruht darauf, daß die Alkylphosphatmoleküle, die in

den ersten Stunden nach der Applikation noch in ausreichender Menge im Gewebe vorliegen, später an Stellen deponiert werden, an denen sie nicht mit der Esterase in Berührung kommen. Wird das Gewebe nun aus dem Körper entnommen, und wird durch das Homogenisieren in vitro eine weitgehende Zerstörung der Strukturen sowie eine vollständige Durchmischung aller Bestandteile herbeigeführt, dann könnte in vitro noch zusätzlich eine Enzymhemmung auftreten, die in vivo nicht vorhanden war (KEWITZ und NACHMANSOHN 1956). Das trifft besonders auf die lipoidreichen Gewebe, z.B. das Gehirn, zu, weil die Alkylphosphate in Fetten besser löslich sind als in Wasser. Sie reichern sich in Fettgeweben vorübergehend an.

Aus den genannten Gründen ist es erforderlich, mit der Antidotgabe so lange zu warten, bis der überwiegende Teil der applizierten Alkylphosphatdosis eliminiert worden ist. Allerdings muß damit gleichzeitig in Kauf genommen werden, daß die Reaktivierbarkeit des phosphorylierten Enzyms mit der Zeit nachläßt. Diese Besonderheit ist in dem vorangehenden Abschnitt am Beispiel der Blutesterasen demonstriert worden. Niederländische Autoren haben gezeigt, daß die Abnahme der Reaktivierbarkeit auf einer nicht enzymatischen Abspaltung eines der beiden Alkylreste von dem an die Esterase gebundenen Phosphat beruht.* Offenbar wird die Bindung des Phosphats an das Enzym dadurch wesentlich fester, so daß die nukleophilen Gruppen der gebräuchlichen Reaktivatoren nicht stark genug sind, um eine Ablösung herbeizuführen.

Um die geschilderten Fehlerquellen auszuschließen, wurde in allen Versuchen an Hunden, die nachfolgend

* (COHEN, J.A., R.A.OOSTERBAAN, H.S. JANSZ, S.BERENDS 1959)

beschrieben sind, das Antidot 15 bis 20 Stunden nach der oralen Applikation des Alkylphosphates injiziert.

Außerdem erhielten alle Tiere unmittelbar nach der Gabe des Parathions zur Milderung der Vergiftungssymptome 1 mg/kg Atropinsulfat subkutan. Unruhige Tiere bekamen 30 bis 60 Minuten vor Einführung der Schlundsonde, mit Hilfe derer das Alkylphosphat gegeben wurde, zur Ruhigstellung 0,2 mg/kg Pontisal^R ein Phenothiazinderivat, intramuskulär.

In den beiden ersten Versuchen wurden außer den Blutesterasen auch die Aktivitäten in einem Stück des geraden Bauchmuskels und einer in Narkose nach Abheben der Schädeldecke entnommenen Probe der Hirnrinde gemessen. Da vor der Vergiftung kein Hirngewebe gewonnen werden konnte, mußte auf die Feststellung der Ausgangsaktivität verzichtet werden. Um dennoch ein Maß für die Reaktivierung zu erhalten, wurde durch Zusatz von Obidoxim zum Homogenat in vitro ermittelt, wieviel reaktivierbare Esterase vorhanden war.

Die Ergebnisse dieser beiden Versuche sind in den Tab. 6 bis 9 dargestellt.

Durch 50 mg/kg Obidoxim i.v. trat eine sehr gute Reaktivierung ein, die an den Erythrozyten schon nach 30 Minuten den Ausgangswert erreichte, und nach einer Stunde war auch die Cholinesterase im Muskel und im Gehirn soweit wiederhergestellt, wie es mit diesem Pharmakon möglich war. Die Plasmaesterase ließ sich nicht vollständig reaktivieren, jedoch wurden 80 bis 85 % des maximal möglichen Effektes er-

zielt. Die verabfolgte Dosis war zu hoch; das Tier starb eine Stunde nach der Obidoximgabe an einer Asystolie.

Im zweiten Versuch wurden zwei Dosen Obidoxim erprobt, die erste betrug 5 mg/kg und lag damit in der Größenordnung der üblicherweise als Einzeldosis beim Menschen angewendeten, die folgende war viermal so hoch und wurde ohne Zeichen toxischer Wirkungen vertragen. Eine Stunde nach der Dosis von 5 mg/kg war an der Plasmaesterase kein Effekt nachweisbar, und genauso wirkungslos blieb die Dosis von 20 mg/kg. Allerdings wurde auch in vitro nur eine geringfügige Reaktivierung erreicht: Sie betrug 6,5 bis 20 % der Ausgangsaktivität. Dagegen ließ sich von der Erythrozytenesterase in vitro 16 bis 20 Stunden nach Eintritt der Vergiftung noch 70 bis 75 % des gehemmten Enzyms reaktivieren. In vivo gelang das mit 5 mg/kg Obidoxim nicht vollständig, wohl aber mit 20 mg/kg.

An der Hirnrinde trat nach 5 mg/kg nur eine Reaktivierung von 16 % des gehemmten Enzyms ein, aber zwei Stunden nach 20 mg/kg waren 60 % und nach vier Stunden 93 % wiederhergestellt. An der Bauchmuskulatur hatten 5 mg/kg keinen nachweisbaren Effekt, 20 mg/kg dagegen im Laufe von vier Stunden den maximal erreichbaren.

h n.d. 1.E605- Gabe	E605 p.o. mg/kg	Obid. i.v. mg/kg	ChE Aktivität in $\mu\text{Mol/ml}$ (od. g/min)							
			Plasma		Erythr.		Hirnr.		Bauchm.	
			a	b	a	b	a	b	a	b
0	2,5	-	1,46	-	1,5	-	-	-	-	-
1	2,5	-	1,2	1,41	1,1	1,42	-	-	-	-
3	-	-	0,42	0,89	1,1	1,42	-	-	-	-
5	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	0	0,25	0	0,85	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	0,4	0,8	0,1	0,2
20	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-
20,5	-	-	0,25	0,32	1,0	0,85	-	-	-	-
21	-	-	0,4	0,47	1,1	0,9	1,02	0,95	0,37	0,35

Tab. 6: Reaktivierung in vivo der nach Parathiongabe gehemmten Cholinesterasen des Blutes, der Muskulatur und der Hirnrinde beim Hund (Bastard ♂, Gewicht 14,2 kg, ca. 2-jährig); Urethannarkose (125 g/kg i.p.)

a) in vivo gemessene Aktivität

b) nach Obidoximinkubation in vitro gemessene Aktivität

h nach 50 mg/kg Obidoxim	Plasma	Erythr.	Hirnr.	Bauchm.
0,5	78	100	-	-
1	85	100	100	100

Tab. 7: Reaktivierung in vivo in % der in vitro reaktivierbaren Enzymaktivität

n n. 6mg/kg Parath. (oral)	Obid. (i.v.) mg/kg	ChE-Aktivität in $\mu\text{Mol/ml}$ od. g/min							
		Plasma		Erythr.		Hirnr.		Bauchm.	
		a	b	a	b	a	b	a	b
0	-	2,0	-	1,0	-	-	-	0,42	-
14	-	0	0,13	0	0,45	0,47	1,4	0	0,4
15	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-
16	20,0	0	0,34	0,29	0,76	0,62	1,37	0	0,12
17	-	0	0,41	0,77	0,73	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	1,03	1,36	0,2	0,26
20	-	0	0,21	0,75	0,7	1,3	1,36	0,36	0,36

Tab. 8: Reaktivierung in vivo der nach Parathiongabe gehemmten Cholinesterasen des Blutes, der Muskulatur und der Hirnrinde beim Hund (Bastard ♂, Gewicht 14 kg, ca. 2-jährig)

a) in vivo gemessene Aktivität

b) nach Obidoximinkubation in vitro gemessene Aktivität

n n. Obid.	mg/kg Obid.	Plasma	Erythr.	Hirnr.	Bauchm.
1	5	0	38,5	16	0
1	20	0	100	-	-
2	-	-	-	62	77
4	-	0	100	93	100

Tab. 9: Reaktivierung in vivo in % der in vitro reaktivierbaren Enzymaktivität

3. Reaktivierung der Cholinesterase in der Hirn-
rinde und in den Stammganglien des Gehirns
beim Hund

In den beiden ersten Experimenten am Hund hatte sich eine Reaktivierung der gehemmten Esterase außer im Blut und in der Muskulatur auch in der Hirnrinde nachweisen lassen. Daraus ergab sich die Frage, ob der gleiche Effekt auch in anderen Hirnregionen zu erreichen wäre. Um sie zu beantworten, wurde versucht, bei einem weiteren Hund, der mit Parathion vergiftet worden war, die eine Großhirnhemisphäre vor der Obidoximinjektion herauszunehmen und die andere eine Stunde danach.

Nach Abheben des Schädeldaches über dem Großhirn und Spalten der Dura mater wurden unter vorsichtigem Luxieren der rechten Hemisphäre die Arteria carotis interna rechts, gleich nach Eintritt in die Schädelhöhle, die Arteriae communicans posterior und anterior und die Arteria vertebralis rechts unterbunden.

Durch einen Mittelschnitt wurden die Hemisphären voneinander getrennt und die rechte nach Durchschneiden der rechten Hirnnerven entnommen.

Gleich danach erfolgte die intravenöse Injektion von 20 mg/kg Obidoxim, eine Stunde später die Herausnahme der anderen Großhirnhälfte.

Die Ergebnisse des Versuches sind in den Tab. 10 und 11 zusammengestellt.

h n. 6mg/kg Parath (oral)	Obid. (i.v.) mg/kg	Plasm.		ChE Aktivität in $\mu\text{Mol/ml}$ (oder g/min)											
				Erythr.		Hirnr.		N.caud.		N.lent.		Thal.		Bauchm.	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
0	-	1,8	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,46	-
1	-	0	1,6	0,08	0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,36
14	-	0	0,6	0	0,45	0,51	2,3	5,6	40,0	0,5	3,7	1,1	6,7	-	-
16	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	0,55	0,9	0,56	0,48	2,1	1,9	34,5	35	5,4	5,8	18	20	0,26	0,26

Tab. 10: Reaktivierung der nach Parathiongabe gehemmten Cholinesterasen in Blut, Hirnrinde, Stammganglien und Muskulatur beim Hund
a) in vivo gemessene Aktivität
b) nach Obidoximinkubation in vitro gemessene Aktivität
(Bastard ♀, Gew. 8 kg, ca. 3-jährig)

h.n. Obid.	mg/kg Obid.	Plasm.	Erythr.	Hirnr.	N.caud.	N.lent.	Thal.	Bauchm.
1	20	60	100	100	100	90	90	100

Tab. 11: Reaktivierung in vivo in % der in vitro reaktivierbaren Enzymaktivität

In den untersuchten Hirnarealen sowie im Muskel und in den Erythrozyten war eine Reaktivierung bis zum maximal erreichbaren Effekt eingetreten, d.h. durch in vitro Inkubation mit dem Reaktivator ließ sich der Aktivitätswert praktisch nicht erhöhen. Die Ausgangsaktivität konnte nicht erreicht worden sein, da 17 Stunden nach Beginn der Hemmung ein Teil des Enzyms durch Obidoxim nicht mehr reaktivierbar ist. Dieser Anteil wird 20 bis 30 % betragen, wie aus den Untersuchungen an Erythrozyten geschlossen werden kann. Im Plasma war die Reaktivierung nach 20 mg/kg Obidoxim deutlich geringer und betrug nur 60 % des in vitro erreichbaren Wertes.

Diese Resultate erschienen nicht ausreichend zuverlässig, da die Hemisphärectomie mit einer erheblichen mechanischen Traumatisierung des Gewebes verbunden war, was aus disseminierten kapillären Blutungen in der zuletzt herausgenommenen Hälfte geschlossen werden konnte. Das ließ wiederum vermuten, daß auch die Blut-Hirnschranke geschädigt und dadurch mehr Obidoxim ins Gehirn eingetreten sein konnte als bei unversehrter Struktur.

Um die Wirksamkeit von Obidoxim im Gehirn zu prüfen, mußten operative Eingriffe und Verletzungen am Gehirn vermieden werden. An der Blut-Hirn-Schranke durften keine zusätzlichen Schädigungen verursacht werden. Deshalb wurde die Wirkungsstärke von Obidoxim an mehreren Tieren ermittelt und anhand von verschiedenen Dosierungen festgestellt, ob eine Dosis-Wirkungs-Beziehung vorliegt.

Alle Tiere erhielten die einheitliche Dosis von 6 mg/kg Parathion durch eine Magenschlundsonde.

Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurde ihnen zur Beruhigung 0,2 mg/kg Ponsital^R intramuskulär gegeben, gleich nach der Sondierung zur Verringerung parasymphathomimetischer Vergiftungssymptome 1 mg/kg Atropinsulfat subkutan.

Nach 14 bis 16 Stunden erhielten die Tiere als Antidot Obidoxim in verschiedenen Dosierungen. Eine Gruppe erhielt nur Kochsalzlösung injiziert.

Gruppe	I	II	III	IV	V
Parathion	6 mg/kg	6 mg/kg	6 mg/kg	6 mg/kg	-
Obidoxim	-	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	-

Tab.: 12: Dosierung

Zwei Stunden später wurden die Tiere in Urethannarkose durch Einstechen einer großkalibrigen Flügel-Kanüle in die Bauchorta schnell entblutet, sofort der Schädel eröffnet und das Gehirn entnommen. Die Ergebnisse der Messungen sind in den Abb. 23, 24 und 25 und in den Tab. 13 und 14 dargestellt.

EG05 p.o. mg/kg	Obid. (i.v.) mg/kg	Plasma			Erythr.			Cortex			N.caud.			N.lent.			Thalam.			M.oblon.			Cereb.			Herzm.			Bauchm.			Zwerchfell		
		a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c			
6	-	0	-	-	0,046	0,5	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
6	-	0	-	-	0,045	0,5	2,3	6	40	-	-	-	-	-	-	-	1,1	5,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
6	-	0	-	-	0,074	0,6	2,0	8	35	6	18	6	18	6	18	6	1,6	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
6	-	0	-	-	0,073	0,3	2,0	6	45	6	24	6	24	6	24	6	0,25	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
6	-	0	-	-	0,060	0,6	1,8	12	49	5	17,5	5	17,5	5	17,5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
6	-	0	-	-	0,035	0,8	2,2	13	49	6,5	20	13	49	6,5	20	13	1,7	4,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
6	5	-	-	-	0,776	0,86	0,6	1,3	28	20,5	30	28	20,5	30	28	20,5	2,5	4,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	5	0	0,3	-	-	-	1,05	2,1	50	41	6	19	41	6	19	41	-	1,9	4,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	10	0	0,24	0,53	0,93	1,0	2,2	8	36	6	25	8	36	6	25	8	2,2	1,0	2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	10	0	0,8	0,7	0,7	1,0	1,9	10	36	5	17	10	36	5	17	10	1,1	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	10	0	0,54	0,99	0,99	1,1	2,2	10	35	5	16	10	35	5	16	10	1,0	2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	20	0,55	0,9	0,56	0,45	-	-	-	-	26	28	26	28	26	28	26	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	20	0,022	0,75	0,7	0,7	1,0	1,4	24	50	-	-	-	-	-	-	-	3,9	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	20	0,150	0,45	0,7	0,6	1,2	1,6	11	35	10	35	10	35	11	35	10	3,1	4,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	20	0	0,34	0,36	0,5	1,5	2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	20	0,23	0,100	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	71	40	71	40	71	40	71	76	76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Tab. 13: Esteraseaktivität in Blut und Gewebe der Parathion-
vergifteten Gruppen ohne Antidot und mit 5 Verschie-
denen Obidoximdosissen behandelten Hunde.

a = in vivo gemessene Aktivität
b = nach Inkubation mit Reaktivator gem. Aktivität
c = Prozent Reaktivierung als Quotient aus den
Mittelwerten von a + b

$$(c = \frac{a}{b} \times 100)$$

Erläuterungen s. Text Seite 67-69.

Obid. (i.v.) mg/kg	Pl.	Ery.	Cort.	N. caud.	N. lent.	Thal.	M. obl.	Cereb.	Herzm.	Bauchm.	Zwerchf.
0	0	0	28	20,5	30	28,5	30	26	31	20	22,5
5	0	90	50	25	30	43	-	-	100	100	100
10	0	87	50	26	28	50	45	32	100	100	100
20	23	100	71	40	-	76	58	50	100	100	100

Tab. 13: Esteraseaktivität in Prozent des in vitro reakti-
vierten Anteils der Cholinesterase, 14 bis 16 Stun-
den nach Vergiftung mit 6 mg/kg Parathion (oral)

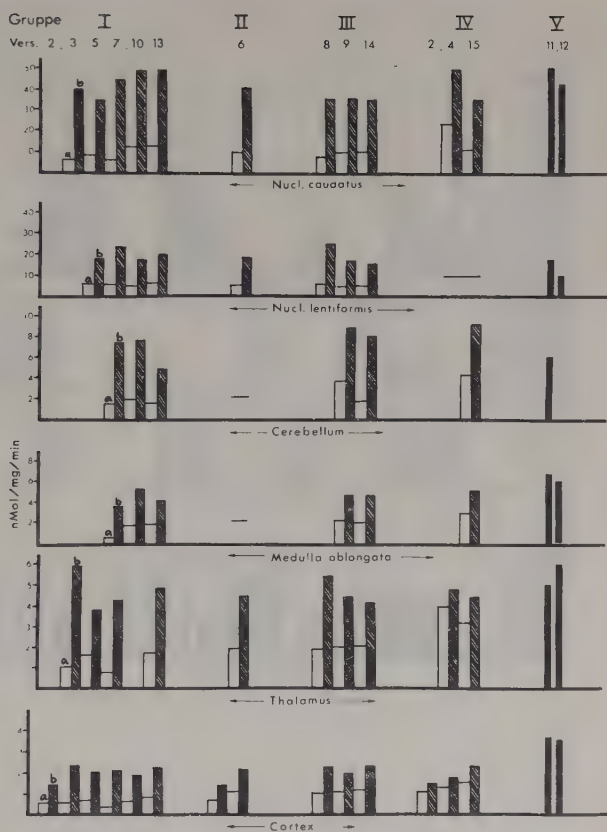


Abb. 23: Ergebnisse der Experimente am Hund:

Direkt (a) und nach Inkubation mit Reaktivator (b) gemessene Esteraseaktivität in 6 unterschiedlichen Hirnarealen

(Gruppen I - V mit unterschiedlicher Parathion- und Obidoximdosierung, s. Tab. 12)

Erläuterungen s. S. 67 ff.

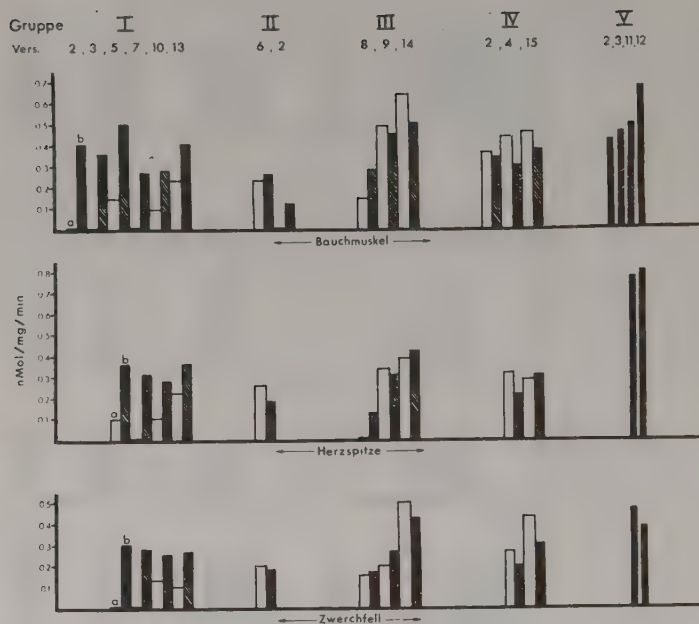


Abb. 24: Ergebnisse der Experimente am Hund:
Esteraseaktivität in 3 verschiedenen Muskel-
geweben
(Gruppen I - V mit unterschiedlichen Parathion-
und Obidoximdosierungen s. Tab. 12)
Erläuterungen s. S. 67 ff.

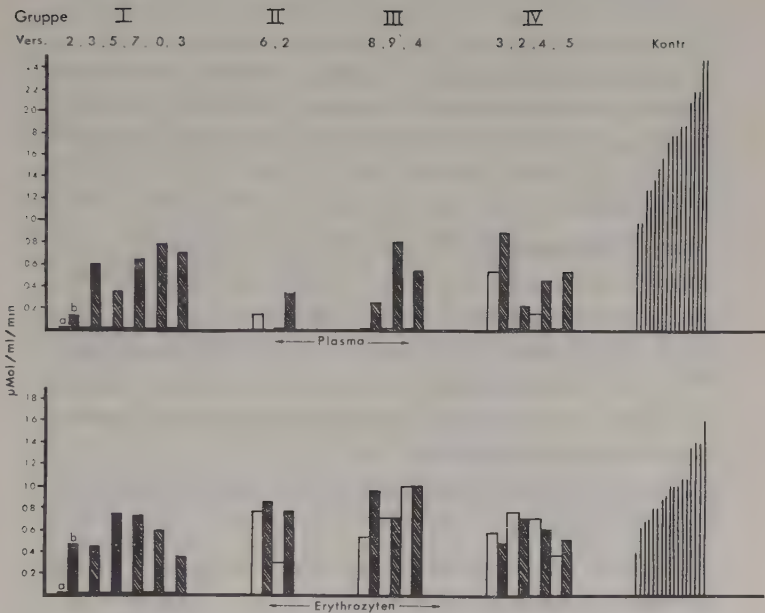


Abb. 25: Ergebnisse der Experimente am Hund:
Direkt (a) und nach Inkubation mit Reaktivator (b) gemessene Esteraseaktivität im Blut (Gruppen I - IV mit unterschiedlichen Obidoximdosierungen und Kontrollen s. Tab. 12)
Erläuterungen s. S. 67 ff.

4. Übersicht über die Ergebnisse der Experimente am Hund

In den Abbildungen 23, 24, und 25 und in Tab. 13 und 14 wurden die Ergebnisse der Experimente mit Hunden - außer dem ersten mit der höheren Oximdososis von 50 mg/kg - zusammengestellt.

Zu Abb. 23:

Jedes Einzelergebnis ist als Säule dargestellt. In der Abbildung sind die fünf Gruppen mit verschiedener Dosierung nebeneinander angeordnet. In den Gruppen I bis IV stellen die offenen Säulen die Werte "a" dar:

a = in der Probe direkt gemessene Aktivität, ohne Zusatz von Reaktivator,

daneben bedeuten die schraffierten Säulen die zugehörigen Werte "b":

b = nach 2-stündiger Inkubation der Probe mit Reaktivator gemessene Aktivität.

In Gruppe V waren die unvergifteten Tiere. Sie sind als ausgefüllte Säule dargestellt.

Für jedes der sechs Hirnareale wurde eine Zeile gewählt. In der Horizontalen entsprechen also eine offene und eine schraffierte Säule zusammen bzw. eine dunkle Säule allein der jeweiligen Gewebeprobe eines Tieres. In der Vertikalen gehören alle untereinander liegenden Säulen zu demselben Versuch.

In derselben Anordnung sind die Ergebnisse von Muskelgewebe und Blut wiedergegeben (Abb. 24 und 25).

Zu Tabelle 13 und 14

Aus der direkt gemessenen Aktivität "a" und der Akti-

vität, die nach Zugabe von Obidoxim in vitro erhalten wurde, "b", läßt sich der prozentuale Anteil der "in vivo"-Aktivität von der maximal erreichbaren errechnen (Spalte c in Tab. 12 und 13). Auf diese Weise werden die Ergebnisse quantitativ vergleichbar, und die Unterschiede der Ausgangsaktivität zwischen den einzelnen Tieren sowie die Variation in der Zusammensetzung fallen weniger stark ins Gewicht; z.B. enthielt der *N. lentiformis* unterschiedliche Anteile an weißer Substanz, so daß die Variation verhältnismäßig groß ist.

Die Esteraseaktivitäten im Gehirn der nicht vergifteten Kontrolltiere ist nicht signifikant höher als in den Proben der gleichen Hirnabschnitte von vergifteten Tiere, die aber in vitro reaktiviert worden waren. Nur in der Hirnrinde könnten die Werte etwas höher liegen. Die Inkubation der Proben von Kontrolltieren mit der zur Reaktivierung in vitro verwendeten Obidoxim-Konzentration veränderte die Enzymaktivität nicht.

Durch Zusatz von Reaktivator in vitro wurden Aktivitäten der verschiedenen Hirnareale in allen Tiergruppen auf die gleichen Werte erhöht. Die Reaktivierbarkeit in vitro war somit unabhängig davon, ob bereits in vivo eine Reaktivierung eingetreten war oder nicht.

Von den untersuchten Arealen hatte der *N. caudatus* die höchste Esteraseaktivität. Im *N. lentiformis* betrug sie knapp die Hälfte davon, im Kleinhirn etwa ein Fünftel, im Thalamus ein Zehntel und in der Medulla oblongata und der Hirnrinde etwa ein Zwanzigstel.

Die Effekte von Obidoxim sind aus Tab. 14 zu ersehen. An der Plasmaesterase ist nur mit Dosen über 20 mg/kg eine Reaktivierung zu erreichen. An den Erythrozyten, an Zwerchfell, Herzmuskel und Bauchmuskel tritt schon mit 5 mg/kg die maximal erreichbare Wirkung ein. Im Zentralnervensystem dagegen ist die Reaktivierung weniger ausgeprägt und erst durch höhere Dosen zu erzielen. An den Nuclei caudatus und lentiformis waren 5 mg/kg und 10 mg/kg wirkungslos, erst 20 mg/kg vermochten die Aktivität auf 40 Prozent des erreichbaren Wertes zu erhöhen. In ungefähr gleichem Umfang ließ sich das gehemmte Enzym des Kleinhirns und der Medulla oblongata in vivo reaktivieren. Günstiger war der Effekt im Thalamus und in der Hirnrinde. In beiden Arealen führten Dosen von fünf bis zehn mg/kg auf fast den doppelten Wert und 20 mg/kg auf das Zweifache.

Daraus ist zu schließen, daß eine beträchtliche Reaktivierung der gehemmten Cholinesterase im Gehirn erreicht werden kann, und daß das Produkt aus der Konzentration und der Einwirkungsdauer von Obidoxim in der Hirnrinde und im Thalamus größer ist als im Kleinhirn, in der Medulla oblongata, im N. caudat. und im N. lentiformis. Dadurch bedingt tritt im Thalamus und in der Rinde eine deutlichere und von der Dosis abhängige Reaktivierung ein.

II. Bestimmung der Esteraseaktivität im Gehirn der Maus nach Paraoxon-Vergiftung und nach Behandlung mit Obidoxim

Die zuvor beschriebenen Versuche an Hunden haben gezeigt, daß mit Obidoxim eine Reaktivierung auch im Gehirn erreicht werden kann. In früheren Versuchen mit 2-PAM an Mäusen war keine Reaktivierung der Hirn-

esterasen gefunden worden (KEWITZ 1956). Dieser Unterschied könnte entweder darauf beruhen, daß Obidoxim besser durch die Blut-Hirn-Schranke penetrieren kann als 2-PAM oder darauf, daß die Blut-Hirn-Schranke beim Hund für Obidoxime mit quartärem Stickstoff, d.h. stark positiver Ladung, durchlässiger ist als bei der Maus.

Um die zuerst aufgeführte Alternative zu prüfen, wurde untersucht, ob die durch Paraoxon gehemmte Cholinesterase im Gehirn der Maus nach der Injektion von Obidoxim eine höhere Aktivität aufweist.

Versuch 1):

Die Tiere wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Jedes der Gruppe I und II erhielt 0,5 mg/kg Paraoxon subkutan. Die Mäuse der Gruppe I wurden fünf Stunden später getötet und die Esteraseaktivität im Hirnhomogenat bestimmt, sowohl vor als auch nach der Inkubation mit Obidoxim.

In Gruppe II waren die Tiere, die vier Stunden nach Paraoxon 50 mg/kg Obidoxim intravenös bekamen und nach fünf Stunden getötet wurden, damit Aktivität und Reaktivierbarkeit der Esterase im Gehirn bestimmt werden konnte.

Gruppe III war die Kontrollgruppe, der kein Paraoxon sondern eine Stunde vor der Esterasebestimmung 50 mg/kg Obidoxim injiziert wurden.

Die Ergebnisse sind in Tab. 15 wiedergegeben.

Gruppe	Ergebnis	Tier-Nr.				
		1	2	3	4	5
I	a	2,4	3,6	3,4	-	-
	b	12,1	11,8	12,3	-	-
	%Hemmung.	80	70	82	-	-
	x(h=3)	77,3 ± 6,4 % Hemmung				
II	a	4,55	4,25	5,15	4,65	-
	b	12,1	13,2	11,8	11,2	-
	%Hemmung.	62,5	68	56	58,5	-
	x(h=4)	61,2 ± 5,2 % Hemmung				
III	Kontr.	12,0	11,5	12,3	12,2	11,6

Tab. 15: Esteraseaktivität in nMol/mg/min im Hirnhomogenat von Mäusen. Versuch 1): a)= direkt, b = nach in vitro Inkubation m. Reaktivator. Gr. I und II: 0,5 mg/kg Paraoxon s.c.(Nackenfalte) Gr.II und III: 50 mg/kg Obidoxim i.v.(Schwanzvene)

Bei den Tieren der Gruppen I und II waren die Aktivitäten nach der Reaktivierung in vitro durch Inkubation der Hirnhomogenate mit Obidoxim genauso hoch wie in der Kontrollgruppe III. Der entscheidende Befund liegt in dem Unterschied der Hemmung zwischen den Gruppen I und II. Die Hirnesterase war bei den Tieren der Gruppe II durchschnittlich 16 Prozent weniger gehemmt als in Gruppe I. Das könnte auf einer Reaktivierung beruhen oder durch die Reaktion des nach vier Stunden noch vorhandenen freien Paraoxon mit dem Reaktivator bedingt sein. Letztere würde die Einwirkungszeit des Paraoxon gegenüber der Vergleichsgruppe I um eine Stunde verkürzen.

Um zu ermitteln, welcher der beiden möglichen Mechanismen zutrifft, mußte ein weiterer Versuch aufgestellt werden. In diesem wurden erstens zwei verschiedene Oximdososen verwendet und zweitens je eine Gruppe vier und fünf Stunden nach der Paraoxongabe ohne vorherige Oximbehandlung zur Esterasebestimmung getötet.

Wenn eine Reaktivierung im Gehirn stattfindet, müßte diese dosisabhängig sein, und die Esteraseaktivität müßte höher liegen als der Wert vier Stunden nach Paraoxongabe.

Versuch 2):

Tiere der Gruppe I erhielten 0,5 mg/kg Paraoxon subkutan und wurden nach vier Stunden zur Esterasebestimmung des Gehirns getötet.

In Gruppe II bekamen sie ebenfalls 0,5 mg/kg Paraoxon subkutan, wurden aber erst nach fünf Stunden zur Esterasebestimmung getötet.

Dagegen wurden die Mäuse in Gruppe III vier Stunden nach der Gabe von 0,5 mg/kg Paraoxon subkutan mit 20 mg/kg Obidoxim behandelt und eine Stunde später getötet.

Das Gleiche erfolgte in Gruppe IV, jedoch betrug die Dosis von Obidoxim 40 mg/kg, war also doppelt so groß wie in Gruppe II.

Die Ergebnisse sind in Tab. 16 zusammengefaßt.

Gruppe	Ergebnis	Tier-Nr.				
		1	2	3	4	5
I	a	3,1	3,6	4,4	2,4	-
	b	10,8	11,0	10,6	11,3	-
	%Hemmung.	71	67	58,5	79	-
	x(h=4)	68,8 $\pm$ 8,5 % Hemmung				
II	a	1,2	1,75	1,85	-	-
	b	9,7	11,1	11,0	-	-
	%Hemmung.	88	84	83	-	-
	x(h=3)	85 $\pm$ 2,6 % Hemmung				
III	a	4,0	3,2	2,55	3,35	3,6
	b	10,6	11,6	10,2	10,2	10,6
	%Hemmung.	62	72	75	67	66
	x(h=5)	68 $\pm$ 5,1 % Hemmung				
IV	a	2,6	2,6	3,5	3,75	-
	b	10,6	11,4	10,9	11,7	-
	%Hemmung.	75	77	68	68	-
	x(h=4)	72 $\pm$ 4,7 % Hemmung				

Tab. 16: Esteraseaktivität in nMol/mg/min im Hirnhomogenat von Mäusen

Versuch 2): Gruppe I-IV: 0,5 mg/kg Paraoxon s.c.

" III : 20 mg/kg Obidoxim i.v.

" IV : 40 mg/kg Obidoxim i.v.

Aus dem Versuchsergebnis ergibt sich, daß zwischen den Gruppen I, III und IV kein Unterschied im Ausmaß der Esterasehemmung des Gehirns vorliegt. Bei der Gruppe II war dagegen eine stärkere Hemmung vorhanden. Es muß geschlossen werden, daß keine Reaktivierung sondern durch die Gabe des Antidots ein Abbruch der Einwirkungsdauer erfolgt ist, denn die Wirkung beider Dosen ist identisch, und die Enzymaktivität der Gruppen III und IV entspricht der, die zum Zeitpunkt der Antidotapplikation in Gruppe I gemessen wurde. Die Aktivität ist also nicht angestiegen sondern nur nicht weiter abgefallen.

Bevor jedoch die Unterschiede zwischen Hund und Maus auf eine verschiedene Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke bei diesen beiden Spezies zurückgeführt werden konnten, mußte der Einfluß der Urethannarkose, die bei den Hunden angewandt worden war, geprüft werden.

Ein weiterer Versuch an Mäusen wurde so ausgeführt, daß er mit den Untersuchungen am Hund möglichst gut vergleichbar war.

Versuch 3):

Die Tiere der Kontrollgruppe I erhielten 0,5 mg/kg Paraoxon subkutan und 16 Stunden danach 1,25 g/kg Urethan intraperitoneal. Nach 17 Stunden wurde die Esteraseaktivität im Gehirn bestimmt.

Mit den Tieren der Gruppe II wurde genauso verfahren, nur bekamen sie nach 17 Stunden 20 mg/kg Obidoxim intravenös und erst nach 18 Stunden erfolgte die Esterasebestimmung.

Bei der Gruppe III wurde lediglich die doppelte Menge Obidoxim, nämlich 40 mg/kg verwendet, die Behandlung wurde wie bei Gruppe II durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigt Tab. 17.

Gruppe	Ergebnis	Tier-Nr.				
		1	2	3	4	5
I	a	3,5	4,6	4,1	4,8	4,45
	b	10,9	10,8	11,5	10,0	9,5
	%Hemmung.	68	57,5	64	52	53
	x(h=5)	59 $\pm$ 7,0 % Hemmung				
II	a	3,9	3,35	3,5	4,3	-
	b	10,0	9,0	9,8	9,0	-
	%Hemmung.	61	62,5	64	63	-
	x(h=4)	63 $\pm$ 1,2 % Hemmung				
III	a	4,6	4,8	4,8	5,2	4,8
	b	9,9	10,7	9,7	9,6	10,3
	%Hemmung.	53,5	55	50,5	46	53,5
	x(h=5)	52 $\pm$ 3,6 % Hemmung				

Tab. 17: Esteraseaktivität in nMol/mg/min im Hirn-homogenat von Mäusen

Versuch 3): Gruppe I-III: 0,5 mg/kg Paraaxon s.c.
 " II : 20 mg/kg Obidoxim i.v.
 III : 40 mg/kg Obidoxim i.v.
 I-III: 1,25 g/kg Urethan i.p.

Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, daß die Narkose mit Urethan die Wirksamkeit des Antidots im Gehirn nicht verbessert hat.

III. Cholinesterase-Aktivität in einzelnen Hirnregionen eines an E 605^R-Vergiftung gestorbenen Patienten

Der 55-jährige Mann (H.L.) hatte ca. 55 Stunden bevor er starb in suizidaler Absicht eine nicht feststellbare Menge Folidol^R-Öl - eine 0,5 prozentige Lösung von Parathion in Mineralöl - getrunken. Als er aufgefunden wurde, bestand eine Asystolie. Unter äußerer Herzmassage und Beatmung brachte ihn der Rettungswagen ins Städt. Krankenhaus am Urban in Berlin 61. Dort kam er auf die Intensivpflege-Station, wurde künstlich beatmet und erhielt nach Magenspülung und Gabe von Tierkohle am 1. Tag 28,5 mg Atropin intravenös, am 2. und 3. Tag insgesamt 184,5 mg Atropin intravenös in jeweiligen Einzeldosen von 0,5 bis 1,0 mg. Außerdem wurden am 1. Tag und am 2. Tag 3 mal täglich 250 mg Toxogonin^R intravenös injiziert.

Etwa 48 Stunden nach der Einnahme von E 605^R und nach mehrfacher Applikation von Toxogonin^R wurde die Cholinesterase im Plasma und in den Erythrozyten bestimmt. Im Plasma fand sich keine Aktivität, in den Erythrozyten dagegen wurden 3,1 μ Mol ACh/ml.min gespalten, d.h. ca. ein Drittel des durchschnittlichen Wertes bei gesunden Personen (Abb. 27). Durch Inkubation mit Obidoxim in vitro ließ sich die Enzymaktivität weder im Plasma noch in den Erythrozyten reaktivieren. Der Patient, der das Bewußtsein nicht wiedererlangt und ständig krampfartige Zuckungen der Muskulatur gehabt hatte, verstarb. Die Sektion ergab ein hochgradiges Lungenödem bei eitriger Bronchopneumonie.

Im Zusammenhang mit den im vorigen Abschnitt geschilderten Experimenten am Hund erschien es aufschlußreich,

bei diesem Verstorbenen die Aktivität der Cholinesterase in verschiedenen Teilen des Gehirns zu bestimmen. Zum Vergleich wurden diese Untersuchungen auch an zwei Gehirnen vorgenommen, die von Patienten stammten, die nicht an einer E 605^R-Vergiftung gestorben waren.

Bezüglich des Geschlechts und Alters waren die Fälle vergleichbar (Tab. 18):

Patient	1 H.L. ♂	2 B.P. ♂	3 G.F. ♂
Alter	55 J.	65 J.	70 J.
Diagnose	Alkylph.	Pankr.C.A.	Herzinf.
Tage bis Sektion	4	2	2

Da der Zeitraum bis zur Sektion im Falle der Alkylphosphatvergiftung größer als in den Vergleichsfällen war, wurden in einigen Proben der letzteren Kontrollmessungen nach zwei Tagen vorgenommen. Es wurde keine Aktivitätsminderung festgestellt. In Tab. 19 sind die Aktivitätswerte der drei Gehirne wiedergegeben:

Hirnnareal	Aktivität in nMol/mg/min			
	1	2	3	
N. Caud.	-	-	40	44
Putamen	17	28-31	55	60
Pallidum	13,5	40-100	10,4	33
N.niger	5,1	70-80	6,4	7,5
N.amygd.	-	-	8,7	13
Hypoth.	2,3	50-63	3,65	4,7
Thal.	1,7	45-60	2,85	3,65
Cort.	0,75	50-62	1,2	1,5
Cerebell.	-	-	9,7	11,8
Med.obl.	1,7	47-53	3,2	3,6
N.ruber	2,1	-	-	-
Balken	0	-	-	-
Format.ret.	3,5	-	-	-
Hippocamp.	1,3	-	-	-

Im N.niger ist die Cholinesterase-Aktivität bei dem vergifteten nicht wesentlich geringer gewesen als bei den anderen Verstorbenen. In allen anderen untersuchten Regionen war deutlich weniger aktives Enzym vorhanden: In der Hirnrinde, im Thalamus und im Putamen etwa die Hälfte von der Konzentration, die in den nicht vergifteten Hirnen zu finden war. Durch Inkubation mit Obidoxim in vitro war keine Reaktivierung der Esterase des vergifteten Hirns zu erreichen.

Nach den Erfahrungen aus den Experimenten mit Hunden muß geschlossen werden, daß bei einer so schweren Vergiftung, wie sie hier vorlag, die Cholinesterase des Gehirns auf weniger als 20 Prozent absinkt, denn bei den Hunden bewirkte bereits eine Dosis, die nicht zur Bewußtlosigkeit führte, eine Hemmung diesen Ausmaßes. Da jedoch nur eine etwa 50-prozentige Hemmung bei dem vergifteten Patienten festgestellt wurde, ist zu vermuten, daß durch die am ersten und zweiten Tag verabfolgten Dosen von Obidoxim eine Reaktivierung der Cholinesterasen im Gehirn erfolgt ist. Der Patient konnte dennoch nicht gerettet werden. Der Mißerfolg der Therapie muß nicht auf das Versagen der Antidotwirkung zurückgeführt werden. Da der Patient frühzeitig einen Herzstillstand hatte, konnten dessen Folgen den Tod herbeigeführt haben.

IV. Esteraseaktivität im Blut bei zwei Patienten nach Parathionvergiftung und Reaktivierung in vitro

Zwei weitere Fälle mit E 605^R-Vergiftung, die überlebt haben, sollen hier angefügt werden um zu zeigen, wie limitiert die Aussagen über die Wirksamkeit von Reaktivatoren sind, wenn nur die Aktivität der Cholinesterasen des Blutes bestimmt werden.

Fall 1):

Eine 46-jährige Frau (G.P.) hatte etwa 100 ml Folidol^R (0,5 % Parathion) zu sich genommen, d.h. etwa 8 mg/kg E 605^R. Nach sechs Stunden war die Patientin in tiefer Bewußtlosigkeit und mit Atemstillstand in ein Krankenhaus eingeliefert worden. Sie wurde sofort künstlich beatmet und erhielt nach der Magenspülung in kurzen Abständen Atropin und mehrfach Toxogonin^R intravenös. Die verabreichten Dosen sind in Tab. 20 angegeben.

Datum	Tag nach Vergiftg.	Atropinsulfat (i.v.) mg/die	Toxogonin ^R (i.v.) Einzeldosen à 250mg
17.	1	16,5	3
18.	2	14,5	-
19.	3	7,0	1
20.	4	14,0	2
21.	5	12,0	-
22.	6	19,0	1
23	7	11,0	1
24.	8	-	1
25.	9	-	1

Tab. 20: Therapieschema bei Parathionvergiftung
der Pat. G.P.

Zunächst besserte sich der Zustand und die Patientin kam wieder zu sich; am zweiten Tag trat erneut eine Bewußtseinsstörung ein, die jedoch am dritten Tage wieder verschwand. Am siebten Krankheitstag wurde die Patientin in unsere Innere Klinik verlegt.

Von diesem Tage an wurden täglich die Cholinesterase-Aktivitäten im Plasma und in den Erythrozyten bestimmt

und ihre Reaktivierbarkeit in vitro geprüft. Die Ergebnisse sind als Kurven in Abhängigkeit von der Zeit in Abb. 26 zusammengestellt. Im Plasma fand sich zunächst keine Cholinesterase-Aktivität, während in den Erythrozyten knapp $4 \mu\text{Mol ACh/ml} \times \text{min}$ gespalten wurden. Gemessen am Durchschnitt der Normalwerte (Abb. 27) von $10,6 \mu\text{Mol/ml} \times \text{min}$ lag also eine ca. 60-prozentige Hemmung vor. Da die eingenommene Menge von Parathion verhältnismäßig hoch war, ist anzunehmen, daß anfänglich auch die Azetylcholinesterase in den Erythrozyten nahezu vollständig gehemmt gewesen ist. Der Anstieg der Aktivität könnte demnach auf die am ersten Krankheitstag vorgenommenen Injektionen von $3 \times 250 \text{ mg Toxogonin}^R$ zurückgeführt werden. Die später (am 3., 4., 6. bis 9. Tag) verabfolgten Dosen dürften keinen wesentlichen Effekt mehr gehabt haben. Die Wirkungslosigkeit an der Plasma-Cholinesterase war aufgrund der experimentellen Befunde zu erwarten. In den Blutproben, die hier untersucht wurden, konnte keine Reaktivierung in vitro mehr erreicht werden.

Der am achten Tag allmählich eintretende Anstieg der Plasma-Cholinesterase-Aktivität hielt bis zum 22. Tag an, u.z. bis in der Norm liegende Werte (vgl. Abb. 27) wieder vorlagen. Diese Erholung ist als Ausdruck der Synthese von Cholinesterase aufzufassen und nicht als Reaktivierung des gehemmten Enzyms.

Die Azetylcholinesterase in den Erythrozyten nahm nach dem 14. Tag ebenfalls allmählich zu. Dieser Anstieg war am 27. Tag noch nicht abgeschlossen und muß wohl als Erneuerung der Erythrozyten gedeutet werden.

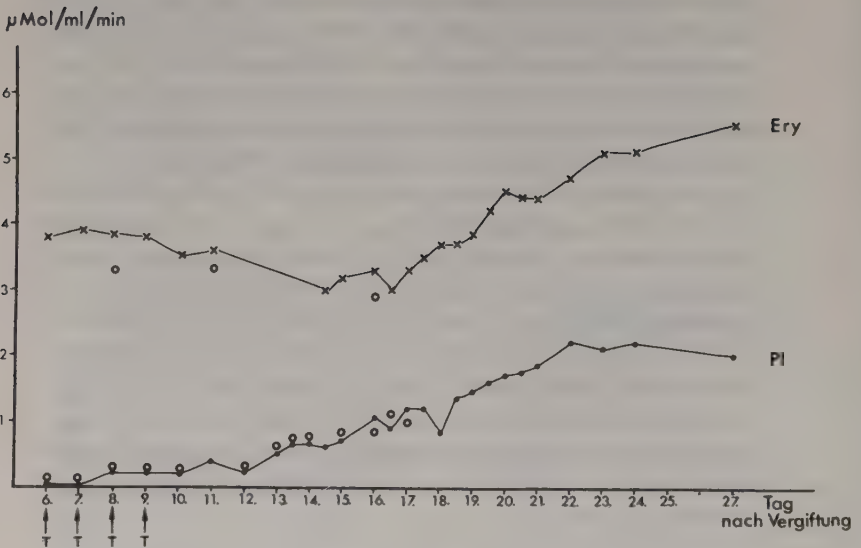


Abb. 26: Esteraseaktivität im Blut vom 6.-27. Tag nach Parathionvergiftung. Durch Inkubation mit Obidoxim in vitro wurde keine Reaktivierung erreicht (als Kreise eingezeichnete Meßwerte). Pfeile T: verabfolgte Obidoximinjektionen.

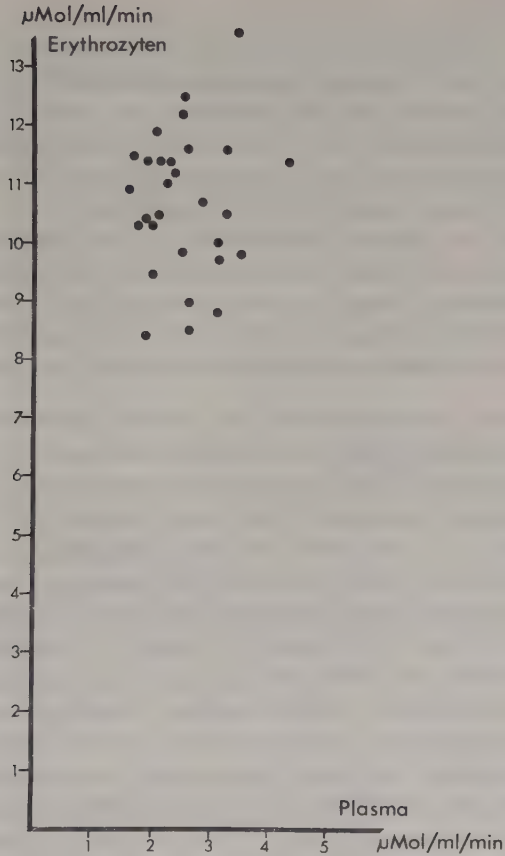


Abb. 27: Darstellung der Esteraseaktivität in Plasma und Erythrozyten von 29 gesunden Probanden beiderlei Geschlechts und verschiedenen Alters als "Wolke";

durchschnittliche "Normalwerte":

Pl: 2,31 $\pm$ 0,84 μ Mol/ml/min

Erythr.: 10,6 $\pm$ 1,2 μ Mol/ml/min

Fall 2):

Der 24-jährige Patient (P.S.), der bereits zuvor einen Suizidversuch unternommen hatte, hatte eine nicht bekannte Menge Parathion mit einer Flüssigkeit aufgenommen, die von Angehörigen des Patienten mitgebracht worden war, und die nach ihrer Aussage "E 605^R aus einer kleinen Ampulle" enthielt. Es handelte sich demnach wahrscheinlich um das 50 %ige Präparat E 605 forte^R, woraus auch der Geruch und das hellblau-milchige Aussehen der mit Bier vermischten Giftbrühe hindeuteten. Eine Untersuchung auf ihre esterasehemmende Eigenschaft erfolgte später.

Der Mann wurde bereits zwei Stunden nach Giftaufnahme in die Intensivstation unserer Inneren Klinik eingeliefert und mußte künstlich beatmet werden. Nach der Magenspülung erhielt er sofort Atropin und 250 mg Toxogonin^R intravenös. Vor der Antidotgabe war im Nachtdienst keine Blutprobe entnommen worden. Um 9 Uhr morgens wies die Azetylcholinesterase der Erythrozyten eine in dem Normalbereich liegende Aktivität auf, durch Inkubation mit Obidoxim in vitro ließ sie sich nicht weiter erhöhen. Anders verhielt sich die Cholinesterase des Plasmas. Um 9 Uhr morgens ließ sich keine Aktivität nachweisen, aber nach Inkubation mit Obidoxim in vitro wurde eine Spaltung von $0,7 \mu\text{Mol ACh/ml} \times \text{min}$ gemessen. Daraufhin erfolgte um 15 Uhr eine intravenöse Injektion von 250 mg Toxogonin^R, die zum Anstieg der Plasma-Cholinesterase-Aktivität führte, so daß am nächsten Morgen bereits eine Aktivität von $0,3 \mu\text{Mol/ml} \times \text{min}$ vorlag (Abb. 29). Zu diesem Zeitpunkt war in vitro nur noch eine Reaktivierung bis auf $0,45 \mu\text{Mol/ml} \times \text{min}$ möglich. Zwei weitere Injektionen von je 250 mg um 9.30 Uhr und um 11.30 Uhr steigerten die Cholinesterase-Aktivität des

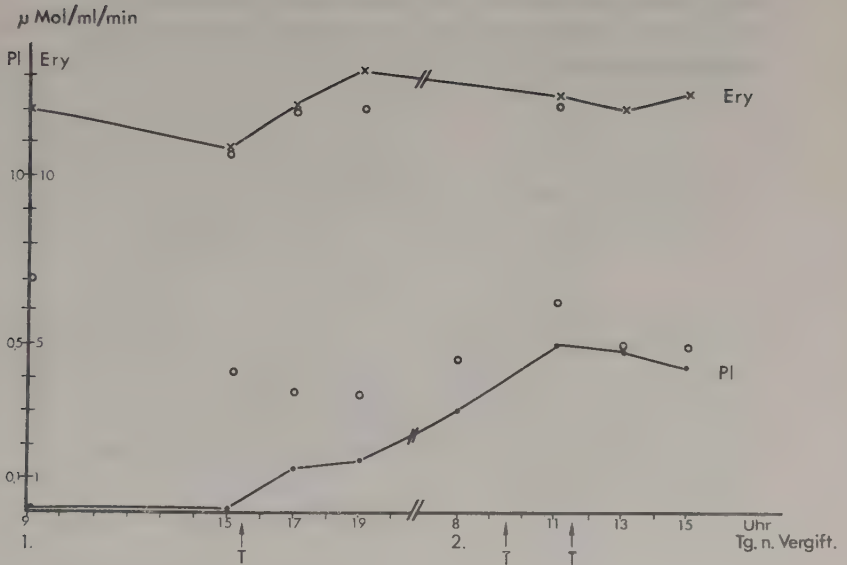


Abb. 26: Esteraseaktivität in Blut nach Parathionvergiftung. Durch Obidoximinkubation in vitro konnte im Plasma eine Reaktivierung erreicht werden (als Kreise eingezeichnete Meßwerte). Pfeile T: verabfolgte Dosen von 250 mg-Obidoxim

Plasmas auf $0,5 \mu\text{Mol/ml} \times \text{min}$. Dieser Wert mußte als der mit Obidoxim erreichbare angesehen werden, denn eine weitere Erhöhung blieb nach der Inkubation in vitro aus (Abb. 29). Der Patient, der mit schweren Vergiftungssymptomen in das Krankenhaus eingeliefert worden war, verließ dieses auf eigenen Wunsch bereits 48 Stunden später.

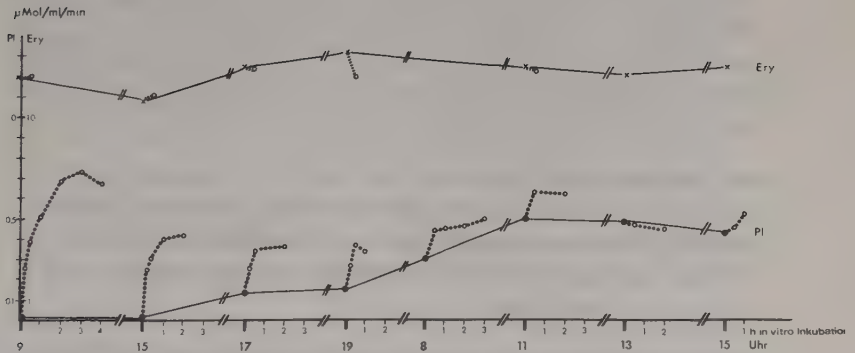


Abb. 29: Verlauf der Esteraseaktivität im Blut nach Parathionvergiftung mit den jeweils in der Probe durch 2 - 4-stündige Obidoximinkubation in vitro erreichten Werten.

PL Ery

• ——— • x ——— x gemessene Aktivität

o o o ' ' ' ' o nach Reaktiv. in vitro gem. Aktivität

Diskussion

Die mitgeteilten Ergebnisse zeigen, daß Obidoxim beim Hund die Cholinesterasen nach Vergiftung mit Parathion in vivo zu reaktivieren vermag. Für die Reaktivierung der Azetylcholinesterase der Erythrozyten, der Skelettmuskulatur und des Herzens reicht die Dosis von Obidoxim aus, die beim Menschen angewendet wird, nämlich ca. 5 mg/kg intravenös. Die Aktivität der Plasmacholinesterase dagegen wird durch diese Dosis und auch durch die zwei- oder vierfach höhere nicht meßbar reaktiviert. Das Gleiche fanden HAHN und HENSCHLER in Versuchen am Hund, in denen nur die Blutesterasen untersucht worden waren.

Mit den Resultaten stimmen die in vitro Versuche gut überein, die ergaben, daß die reaktivierende Wirkung von Obidoxim und 2-PAM gegenüber der Plasmacholinesterase 100 mal geringer ist als gegenüber der Azetylcholinesterase der Erythrozyten.

Da es sich bei dem in den cholinergen Neuronen des Nervensystems vorhandenen Enzym um Azetylcholinesterase handelt, ist die Aktivität der in den roten Blutzellen enthaltenen Esterasen als Indikator für die Beurteilung des Vergiftungsgrades brauchbar, die der Plasmacholinesterase dagegen nicht.

Nach diesen Feststellungen ist zu fragen, weshalb einige Autoren bei der Vergiftung des Menschen mit Obidoxim keine Reaktivierung nachweisen konnten. Zunächst wäre es möglich, daß eine Spezies-Differenz vorliegt, die Cholinesterasen des Menschen nach der Hemmung durch Alkylphosphate gegenüber der reaktivierenden Wirkung von Obidoxim also weniger empfindlich sind.

Nach den eigenen Versuchen liegen für diese Annahme keine Anhaltspunkte vor; der Vergleich der Reaktivierung

im Blut des Menschen mit der im Blut von Hunden zeigt keine wesentlichen Unterschiede. Die Divergenz in den Resultaten ist deshalb nicht mit Spezies-Unterschieden zu erklären. Als weitere Deutungsmöglichkeit müssen Unterschiede im virtuellen Verteilungsvolumen für Obidoxim bei Mensch und Hund in Betracht gezogen werden. Beim Menschen könnte das Obidoxim zusätzlich in Kompartimente eindringen, in die es beim Hund nicht gelangt, so daß das Verteilungsvolumen beim Menschen größer und damit die Konzentration im Blut kleiner ist als beim Hund. Jedoch könnte dieser Unterschied höchstens zu einer Verminderung der Konzentration um 50 Prozent führen, falls das Verteilungsvolumen beim Menschen doppelt so groß ist wie beim Hund, z.B. durch Einbeziehung des gesamten Intrazellulärtraumes zusätzlich zum Extrazellulär-volumen. Das könnte zwar eine Minderung aber nicht einen völligen Verlust der Wirkung erklären.

Theoretisch käme auch eine Spezies bedingte besonders starke Bindung von Obidoxim an bestimmte Organbestandteile in Frage. Aber bisher sind Untersuchungen, aus denen sich Hinweise für diese Besonderheit ableiten ließen, nicht bekannt geworden.

Infolgedessen ist zu erwägen, ob eventuell methodische Faktoren die Messung der Enzymaktivität und der Reaktivierbarkeit des gehemmten Enzyms beeinträchtigen und zu Mißdeutungen führen könnten. Seit der Entdeckung der Stoffe, die gehemmte Cholinesterasen zu reaktivieren vermögen, ist bekannt geworden, daß

- a) die PlChEn erst durch eine wesentlich höhere Konzentration reaktiviert werden als die AChEn und
- b) die Wirksamkeit mit zunehmender Dauer der Hemmung nachläßt.

Diese Feststellungen wurden durch die eigenen Untersuchungen erneut bestätigt. Durch die therapeutisch in

Frage kommenden Dosen von Obidoxim erfolgte bei der Parathionvergiftung keine Anhebung der Aktivität der P1ChE in vivo. Diese kann somit nicht als Indikator zur Beurteilung der Antidotwirkung herangezogen werden. Dagegen ist die AChE der Erythrozyten auch durch die üblicherweise klinisch verwendeten Dosen sehr gut reaktivierbar. Der Erfolg hängt jedoch stark von dem Zeitpunkt der Anwendung nach eingetretener Vergiftung ab, denn im Laufe von 48 Stunden geht die Reaktivierbarkeit verloren.

Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Therapie in vitro zu prüfen, ob die Cholinesterasen noch reaktivierbar sind. Dazu muß der Reaktivator in einer Konzentration zugefügt werden, die mit Sicherheit am frischvergifteten Enzym eine vollständige Reaktivierung herbeiführt, d.h. 10^{-3} M/l für P1ChE und 10^{-4} M/l für die AChE der Erythrozyten. Die Einwirkungszeit in vitro muß mindestens zwei Stunden betragen. Nach der Inkubation sollte die Enzymlösung zur Messung mindestens auf das fünf- bis zehnfache verdünnt werden, um eine Enzymhemmung durch den Reaktivator selbst auszuschließen, die bei den hohen Konzentrationen, die erforderlich sind, eintreten könnte (vgl. Abb. 14). Diese Hemmung ist jedoch reversibel, sie kann im Gegensatz zur Alkylphosphatwirkung durch Verdünnen rückgängig gemacht werden. Die Prüfung der Reaktivierbarkeit muß unmittelbar nach der Blutentnahme erfolgen. Das Blut darf auch bei kühler Lagerung nicht längere Zeit aufbewahrt werden, weil die Reaktivierbarkeit dadurch verlorenggeht. Ob die Abnahme der Reaktivierbarkeit bei Temperaturen von -40° C bis -60° C langsamer verläuft oder gänzlich unterbleibt, ist nicht bekannt.

Nur wenn eine Reaktivierbarkeit in vitro nachgewiesen werden kann, ist die therapeutische Anwendung von Obidoxim sinnvoll und vertretbar. Aber auch der Zeitpunkt der Blut-

entnahme nach der Oximinjektion ist für den Nachweis der Wirkung des Antidots von entscheidender Bedeutung. Der günstigste Zeitpunkt wird etwa 60 Minuten nach der intravenösen Injektion liegen. Wird das Blut zu frühzeitig entnommen, könnte die Einwirkungszeit nicht ausreichen, wird es zu spät entnommen, bestünde die Möglichkeit, daß durch Nachresorption von Parathion, die noch Tage nach der Aufnahme des Giftes nachzuweisen ist, die Hemmung des bereits reaktivierten Enzyms erneut zunimmt. Diese Zunahme der Hemmung kann auch in vitro bei der Aufbewahrung des Blutes vorkommen, wenn noch Alkylphosphat im Blut vorhanden ist, während das verhältnismäßig schnell ausgeschiedene Antidot auf Konzentrationen abgesunken ist, die nicht mehr wirksam sind. Die Halbwertszeit des Parathion im Körper ist größer, weil es im Fettgewebe gespeichert und von dort allmählich abgegeben wird. Selbst niedrige Konzentrationen können dann in vitro nach längerer Aufbewahrung noch zu einer Hemmung führen. Obidoxim dagegen hat eine Halbwertszeit von ca. zwei Stunden, ist also nach vier Stunden auf 25 Prozent, nach acht Stunden auf sechs Prozent und nach 12 Stunden auf 1,5 Prozent abgesunken.

Während die Reaktivierung in der Muskulatur und im Herzen etwa mit der der AChE der Erythrozyten parallel läuft, gilt dies nicht für die AChE des Gehirns. Bei Mäusen ist auch mit 50 mg/kg Obidoxim i.v. keine Reaktivierung der Hirnesterase nachzuweisen. Damit sind frühere mit Pralidoxim erzielte Ergebnisse bestätigt. Beim Hund liegen die Verhältnisse offenbar günstiger. Mit 50 mg/kg Obidoxim fand sich eine vollständige Reaktivierung in der Hirnrinde. Jedoch ist diese Dosis für die therapeutische Anwendung zu hoch; denn das mit dieser Dosis behandelte Tier starb nach etwa einer Stunde an einem Herzstillstand, der vermutlich durch das Antidot herbeigeführt worden war.

Um zu ermitteln, ob in allen Hirnteilen die Reaktivierung in gleichem Umfang eintritt, mußten das Gehirn in toto herausgenommen, die einzelnen Abschnitte präpariert und darin die Esterase gemessen werden. Diese Untersuchungen wurden mit drei abgestuften Dosierungen vorgenommen: Mit 5 mg/kg Obidoxim, der beim Menschen üblichen Einzeldosierung, mit 10 mg/kg und mit 20 mg/kg. Obwohl die Ergebnisse wegen der zu geringen Zahl der Einzeluntersuchungen nicht mit statistischen Rechenverfahren ausgewertet werden können, zeigen sie ein eindeutiges Bild.

Die Reaktivierung ist in der Hirnrinde und im Thalamus am stärksten ausgeprägt und bereits mit 5 mg/kg deutlich nachweisbar; die Esteraseaktivität beträgt 40 bis 50 Prozent des in vitro reaktivierbaren Anteils des Enzyms, während bei den vergifteten nicht mit Antidot behandelten Tieren nur 28 Prozent dieses Enzymanteils meßbar war. Mit 20 mg/kg ließ sich die Reaktivierung sogar bis auf über 70 Prozent steigern.

In anderen Regionen des Gehirns war die reaktivierende Wirkung ungünstiger. Im Nucleus caudatus, im Nucleus lentiformis und im Cerebellum trat erst nach 20 mg/kg Obidoxim i.v. eine sicher nachweisbare Aktivitätssteigerung auf, nämlich von 20 bis 30 Prozent auf 40 bis 50 Prozent. Die Medulla oblongata dürfte eine Mittelstellung einnehmen, denn mit 10 mg/kg war eine Erhöhung von 30 auf 45 Prozent und mit 20 mg/kg auf 58 Prozent zu erreichen.

Die unterschiedliche Wirkung von Obidoxim in den einzelnen Hirnarealen hängt nicht mit einer verschieden starken Hemmung der Esterase durch das Alkylphosphat zusammen. Eine mögliche Erklärung findet sie durch Differenzen in der Blutversorgung, Vaskularisation oder Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke.

Welchem Faktor dabei die wichtigste Rolle zukommt, kann aufgrund der gewonnenen Daten nicht entschieden werden.

Für die Therapie scheint bedeutsam zu sein, daß Obidoxim grundsätzlich ins Gehirn eindringt und dort wirksam ist. Als Maßnahme, höhere Konzentrationen im Gehirn zu erreichen, um dadurch die Chance für eine erfolgreiche Therapie zu verbessern, käme die Aufrechterhaltung eines hohen Blutspiegels durch Dauerinfusion von Obidoxim in Betracht.

Über die Reaktivierung der Azetylcholinesterase im Gehirn wurde von ROSENBERG (1959) bei Kaninchen und von HOBBIGER und VOJVODIC (1966) bei Ratten berichtet. Jedoch ist in beiden Arbeiten nicht mit Sicherheit ausgeschlossen worden, daß die höhere Enzymaktivität im Vergleich zu den nicht mit dem Reaktivator behandelten vergifteten Tieren durch die direkte Reaktion zwischen dem Aldoxim und dem Alkylphosphat bedingt war. Aus den eigenen Untersuchungen an der Maus ist ersichtlich, daß dieser Mechanismus eine erhebliche Rolle spielen und zu Mißdeutungen der Ergebnisse führen kann, auch wenn das Antidot erst 4 Stunden nach der Gabe von Paraoxon verabfolgt wird.

In welchem Maße lassen nun die Befunde an den Esterasen des Blutes Schlüsse auf die Reaktivierung im Gehirn zu? Die Daten zeigen, daß mit einer Reaktivierung im Gehirn nur dann zu rechnen ist, wenn die Esteraseaktivität der Erythrozyten vollständig, d.h. der gesamte reaktivierbare Anteil, wiederhergestellt ist. Darüber hinaus kann mit einer Reaktivierung in den für Obidoxim weniger zugänglichen Anteilen gerechnet werden, wenn die im Blut erzielte Konzentration von Obidoxim ausreicht, auch einen Teil der Plasmacholinesterase zu reaktivieren.

Das Untersuchungsergebnis im Gehirn eines nach einer

Parathion-Vergiftung gestorbenen Patienten, der mit Obidoxim behandelt worden war, widerspricht nicht der Annahme, daß auch beim Menschen im Gehirn eine Reaktivierung zu erreichen ist. Der Fall zeigt auch, daß die Hemmung der Hirnesterase nicht die unmittelbare Ursache für den tödlichen Vergiftungsverlauf sein muß.

An zwei weiteren Fällen von Parathion-Vergiftung läßt sich ablesen, daß die Folgerungen, die aus den Tierexperimenten gezogen wurden, auch für den Menschen gelten. In dem ersten Fall lag die Vergiftung schon mehrere Tage zurück, und die Cholinesterasen waren infolgedessen in vitro nicht reaktivierbar; mit einem therapeutischen Erfolg war also nicht mehr zu rechnen. In dem zweiten Fall hatte wahrscheinlich die zwei Stunden nach Giftaufnahme injizierte Obidoxim-Dosis von 250 mg zu einer vollständigen Wiederherstellung der Esteraseaktivität in den Erythrozyten geführt, die des Plasmas dagegen nicht erhöht, sie blieb unmeßbar klein. In vitro ließ sich auch die Plasmacholinesterase sechs Stunden nach Vergiftung durch Obidoxim reaktivieren, während dies im Laufe des folgenden Tages immer weniger möglich war. Ob die weiteren Obidoximgaben zu einer Reaktivierung der Plasmaesterase beigetragen haben, kann nicht entschieden werden. Der Patient erholte sich in so kurzer Zeit, daß auch eine Wirkung des Antidots im Gehirn denkbar wäre.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß Obidoxim bei der Parathion-Vergiftung ein kausal wirkendes Antidot ist.

Zusammenfassung

Durch einzelne Berichte aus Kliniken, die Alkylphosphat-Vergiftete behandelt haben, sind Zweifel an der spezifischen Antidotwirkung von Obidoxim als Reaktivator der gehemmten Azetylcholinesterase ausgelöst worden. Die zur Klärung dieser Situation durchgeführten Untersuchungen und Experimente am Hund führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Obidoxim hat innerhalb der ersten Stunden nach der Einnahme von Parathion den stärksten Effekt, der im Laufe der Zeit nachläßt, so daß nach 48 Stunden keine Wirkung mehr nachzuweisen ist.
2. Mit der beim Menschen therapeutisch üblichen Einzeldosis von etwa 5 mg/kg i.v. ist eine deutliche Reaktivierung der AChE der Erythrozyten zu erreichen, jedoch keine Erhöhung der PlChE-Aktivität.
3. Ein therapeutischer Erfolg ist nur zu erwarten, wenn bei der AChE der Erythrozyten oder möglicherweise bei der Plasmacholinesterase nach zweistündiger Inkubation mit 10^{-4} M/l bzw. 10^{-3} M/l Obidoxim die Aktivität in vitro angestiegen ist, d.h. wenn die Enzyme noch reaktivierbar sind.
4. Die Reaktivierung der AChE der Skelettmuskulatur, im Zwerchfell und im Herzmuskel verläuft etwa so schnell wie in den Erythrozyten.
5. Beim Hund ist auch eine Reaktivierung der AChE im Gehirn zu erzielen, die in der Hirnrinde und im Thalamus schon nach 5 mg/kg nachzuweisen ist, in der Medulla oblongata nach 10 mg/kg und in den Nuclei caudatus und lentiformis sowie im Kleinhirn erst nach 20 mg/kg.

6. Mit einer partiellen Reaktivierung in der Hirnrinde und im Thalamus kann bei einer Dosis gerechnet werden, die zur vollständigen Wiederherstellung des noch reaktivierbaren Anteils der AChE in den Erythrozyten geführt hat. In den für das Antidot weniger zugänglichen Hirnregionen ist erst mit höheren Dosen eine Wirkung zu erzielen, die auch die Plasmacholinesteraseaktivität anheben könnten.
7. Im Gehirn der Maus haben auch 40 mg/kg Obidoxim bei der Paraoxonvergiftung keinen reaktivierenden Effekt.
8. Bei einem Patienten, der fünf Tage nach einer tödlichen Dosis von Parathion trotz Behandlung mit Obidoxim verstorben ist, fanden sich in den verschiedenen Hirnregionen ca. 50 Prozent der normalen AChE-Aktivität.
9. Bei zwei Patienten, die die Parathionvergiftung überlebt hatten, zeigte sich, daß die Wirksamkeit der Antidottherapie aufgrund des Reaktivierungstests in vitro vorausgesagt werden kann.

Die Resultate verdeutlichen, daß Obidoxim zur Wiederherstellung der Esteraseaktivität nach der Alkylphosphatvergiftung fähig ist, wenn es rechtzeitig und in ausreichender Dosierung angewendet wird. Klinisch zu prüfen wäre, besonders im Hinblick auf die Wirkungen im Zentralnervensystem, ob durch eine höhere als die bisher übliche Einzeldosis oder eine Dauerinfusion von Obidoxim die therapeutischen Erfolge verbessert werden können.

Literaturverzeichnis

1. ALDRICH, F.D.: Cholinesterase assays: Their usefulness in diagnosis of anticholinesterase-intoxications. Clin.Toxicol. 4, 455 (1969).
2. ALDRIDGE, W.N.: Differentiation of true and pseudo cholinesterase by organophosphorus compounds. Biochem.J. 53, 62 (1953).
3. - Mechanism of inhibition of cholinesterases by organophosphorus compounds. Biochem.J. 55, 763 (1953).
4. AUGUSTINSSON, K.B.: Distinction between AChE and other cholinester splitting enzymes. Science 2847, 98 (1949).
5. - Methods of biochemical analysis. Vol. V., 4. London: Interscience Publishers Inc., 1957.
6. - Electrophoresis studies on blood plasma esterases. I. Mammalian plasmata. Act.Chem.Scand. 13, 571 (1959).
7. - The Enzymes, Vol. IV., 521. Acad.Press N.Y., London 1961.
8. - Assay methods for Cholinesterases. In: Handb.d.Exp. Pharmakol. XV., 106-128, Springer Verl., Berlin 1963.
9. - Classification and comparative enzymology of the ChEs and methods for their determination. In: Handb.d.Exp. Pharmakol. XV., 89, Springer Verl., Berlin 63.
10. BARCKOW, D., G.NEUHAUS, W.D. ERDMANN: Zur Behandlung der schweren Parathion-Vergiftung mit dem ChE-Reaktivator Obidoxim. Arch.Toxikol. 24, 133 (1969).
11. v.CLARMANN, M., W.D. ERDMANN, D. HENSCHLER, O.R.KLIMMER, L.LENDLE: Die Frage der Oximtherapie bei Alkylphosphat-Vergiftungen. Dtsch.Ärztebl. 64, 1644 (1967).
12. COHEN, J.A., R.A. OOSTERBAAN, H.S. JANSZ, F. BERENDS: The active site of esterases. J.Cell.Comp.Physiol. 54, 231 (1959).
13. - The active site of AChE and related esterases and its reactivity towards substrates and inhibitors. In: Handb.d.exp.Pharmakol. XV., S. 299, Springer Verl., Berlin 1963.

14. DIGGLE, W.M., J.C. GAGE: ChE inhibition in vitro by 0,0-diethyl-0-p-nitrophenylthiophosphate. Bioch. J. 49, 491 (1951).
15. - ChE inhibition by parathion in vivo. Nature V. 168, 998 (1951).
16. DIRKS, E., A.SCHERER, M.SCHMIDT, G.ZIMMER: Beziehung zwischen chemischer Struktur und ChE-reaktivierenden Wirkung bei einer Reihe neuer unsymmetrischer Pyridiniumsalze. Teil II. Arzneim.Forsch. 20, 197 (1970).
17. ENGELHARD, N., W.D.ERDMANN: Ein neuer Reaktivator für durch Alkylphosphat gehemmte AChE. Klin. Wochenschr. 41, 525 (1963).
18. - Beziehungen zwischen chemischer Struktur und ChE-reaktivierender Wirksamkeit bei einer Reihe neuer bisquartärer Pyridin-4-aldoxime. Arzneim.Forsch. 14, 870 (1964).
19. - , K.PRCHAL, M.NENNER: Azetylcholinesterase. Angew. Chem. 79, 604 (1967).
20. ERDMANN, W.D.: Klinische Erfahrungen mit dem Antidot PAM bei E 605^R-Vergiftungen. Dtsch.Med.Woschr. 23, 1014 (1958).
21. - F.SAKAI, F.SCHELER: Erfahrungen bei der spezifischen Behandlung einer E 605^R-Vergiftung mit Atropin und dem Esterase-Reaktivator PAM. Dtsch.Med.Woschr. 32, 1359 (1958).
22. - L.LENDLE: Vergiftungen mit Esterase-blockierenden Insektiziden aus der Gruppe der organischen Phosphorsäureester (E 605^R und Verwandte). Ergebn.Inn. Med.Kinderheilk. 10, 104-184 (1958).
23. - M.v.CLARMANN: Ein neuer Esterasereaktivator für die Behandlung von Vergiftungen mit Alkylphosphaten. Dtsch.Med.Woschr. 45, 2201 (1963).
24. - Reaktivierung phosphorylierter ChEn des ZNSs in vivo. Naunyn-Schmiedeb.Arch.Pharmakol. 246, 83 (1963).
25. - H.ENGELHARD: Pharmakol.-toxikol. Untersuchungen mit dem Dichlorid des Bis-(4-hydroxyimino-methyl-pyridinium-1-methyl)äthers, einem neuen Esterasereaktivator. Arzneim.Forsch. 14, 5 (1964).

26. - Vergleichende Untersuchungen über das Penetrationsvermögen einiger Esterase-reaktivierender Oxime in das ZNS. *Arzneim.Forsch.* 15, 135 (1965).
27. - Antidotbehandlung bei Alkylphosphatvergiftungen. *Arch.Toxikol.* 24, 30 (1968).
28. FALB, A., W.D.ERDMANN: Über die Penetration von ^{14}C -Obidoxim durch die sogenannte Blut-Gehirn-Schranke bei Mäusen und Ratten. *Arch.Toxikol.* 24, 123 (1969).
29. FRAWLEY, J.P., E.C.HAGAN, O.G.FITZHUGH: A comparative pharmacol. and toxicol. study of organic phosphate-anticholinesterase compounds. *J.Pharmacol.Exp.Therap.* 105, 156 (1952).
30. GAGE, J.C.: The significance of blood cholinesterase activity measurements. *Residue Rev.* 18, 159 (1967).
31. GROB, D.: Anticholinesterase intoxication in man and its treatment. In: *Handb.Exper.Pharmakol.*, S. 989, Springer Verl., Berlin 1963.
32. HAGEDORN, D., W.H. GÜNDEL, K. SCHOENE: Reaktivierung phosphorylierter AChE mit Oximen: Beitrag zum Studium des Reaktionsablaufes. *Arzneim.Forsch.* 19, 603 (1969).
33. HAHN, H.L., D. HENSCHLER: Zur Reaktivierbarkeit phosphorylierter ChEn durch Obidoximchlorid in vivo. *Arch.Toxikol.* 24, 147 (1969).
34. HEITMANN, R., K. FELGENHAUER: Die esterolytische Wirkung von Obidoxim (auf Serum-ChE). *Dtsch.Med.Woschr.* 94, 224 (1969).
35. HOBBERGER, F., P.W. SADLER: Protection against lethal organophosphate poisoning by quaternary pyridine aldoximes. *Brit.J.Pharmacol.* 14, 192 (1959).
36. - , M. PITMAN, P.W. SADLER: Reactivation of phosphorylated AChE by pyridinium aldoximes and related compounds. *Biochem.J.* 75, 363 (1960).
37. - Reactivation of phosphorylated AChE. In: *Handb.Exp.Pharmakol.* XV., S 922, Springer Verl., Berlin 1963.
38. - , V.VOJVODIĆ: The reactivation and antidotal actions of TMB-4 and toxogonin^R with particular reference to their effect on phosphorylated AChE in the brain. *Biochem.Pharmacol.* 15, 1677 (1966).

39. - , -: The reactivation by pyridine aldoximes of phosphorylated AChE in the CNS. *Biochem.Pharmacol.* 16, 455 (1967).
40. HOLMSTEDT, B.: Pharmacology of organophosphorus ChE inhibitors. *Pharmacol.Rev.* 3, 567-688 (1959).
41. JENSEN-HOLM, J.: Determination of ChE acitivity in blood and organs by automatic titration. *Act. Pharmacol.Toxicol.* 15, 384 (1959).
42. KEWITZ, H., I.B. WILSON: A specific antidote against lethal alkylphosphate intoxication. *Arch. Biochem. Biophys.* 1, 261 (1956).
43. - , - , D.NACHMANSOHN: A specific antidote against lethal alkylphosphate intoxication. II. Antidotal properties. *Arch.Biochem.Biophys.* 2, 456 (1956).
44. - A specific antidote against lethal alkylphosphate intoxication. III. Repair of chemical lesion. *Arch. Biochem.Biophys.* 2, 263 (1957).
45. KNOLLE, J.: Die klin. Bedeutung der ChE-Bestimmung im Blut bei akuten Intoxikationen mit phosphororganischen Insektiziden. *Klin.Woschr.* 19, 1157 (1970).
46. - Diagnose und Behandlung von Vergiftungen mit phosphororganischen Insektiziden. *Therapiewoche* 200, 414 (1970).
47. KUNST, H. et al: Über die Behandlung von Alkylphosphatvergiftungen. *Dtsch. Med. Woschr.* 25, 2513 (1970).
48. LAMB, J.C., G.M.STEINBERG: Isopropylmethylphosphorylated bisquaternary oximes; powerful inhibitors of cholinesterase. *Bioch.Biophys.Acta* 89, 174 (1964).
49. LORKE, D., G.KIMMERLE: Die Wirkung von Reaktivatoren bei der Vergiftung mit Phosphorsäureestern. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmakol.* 263, 237 (1969).
50. LÜTTRINGHAUS, A., I.HAGEDORN: Quartäre Hydroxyiminomethylpyridiniumsalze. *Arzneim.Forsch.* 14, 1 (1964).
51. MICHEL, H.O.: An electrometric method for the determination of r.b.c. and plasma ChE activity. *J. Labor. Clin.Med.* 34, 1564 (1949).

52. MILOSEVIĆ, M.P., D. ANDJELKOVIĆ: Reactivation of paraoxon-inactivated ChE in the rat cerebral cortex by pralidoxime chloride. *Nature* 210, 206 (1966).
53. NABB, D.P., F. WHITFIELD: Determination of ChE by an automated pH-stat method. *Arch. Environ. Health* 15, 147 (1967).
54. NACHMANSOHN, D., E.A. FELD: Studies on ChE. IV. On the mechanism of Diisopropylfluorophosphate action in vivo. *J. Biol. Chem.* 171, 715 (1947).
55. - Die Rolle des ACh in den Elementarvorgängen der Nervenleitung. *Ergebn. Physiol.* 48, 575 (1955).
56. NAMBA, T., K. HIRAKI: PAM therapy for alkylphosphate poisoning. *J. Am. Med. Assoc.* 166, 1834 (1958).
57. OETTEL, H.: Die Frage der Oximtherapie bei Alkylphosphatvergiftungen. *Dtsch. Ärztebl.* 64, 1134, 1484 (1967).
58. - Erfahrungen einer Giftinformationsstelle. *Dtsch. Ärztebl.* 64, 2720, 2787 (1967).
59. OHNESORGE, F.K.: Wirkungen und Wirkungsmechanismen von Alkan-bis-ammonium-Derivaten bei der Organophosphatvergiftung. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 263, 72 (1969).
60. PEARSON, I.R., G.F. WALKER: AChE activity values: Conversion from the MICHEL to the pH-stat scales. *Arch. Environ. Health* 16, 809 (1968).
61. PICKERING, R.G.: Modifications of the MICHELΔ-pH method for the estimation of plasma, erythrocyte and brain ChE activities of various species of laboratory animals. *Arch. Toxikol.* 3, 179 (1970).
62. PILZ, W., I. JOHANN, E. STELZL: Untersuchungen über die AChE in menschlichem Vollblut und Routinemethode zu deren Bestimmung. *Klin. Wochschr.* 43, 1227 (1965).
63. POZIOMEK, E.J., B.E. HACKLEY, G.M. STEINBERG: Pyridinium-aldoxime. *J. Org. Chem.* 23, 714 (1968).
64. ROSENBERG, P.: In vivo reactivation by PAM of brain ChE inhibited by paraoxon. *Biochem. Pharmacol.* 3, 212 (1960).

65. SCHMIDT, G., J. GRÜTZMACHER: Spätreaktionen an Atmung und Kreislauf nach erfolgreicher Behandlung der Paraoxon-Vergiftung mit Esterasereaktivatoren und Atropin an Katzen. Arch.Toxikol. 24, 102 (1969).
66. SCHOENE, K.: Reaktivierung von O,O-Diäthylphosphoryl-AChE. Reaktivierungs- und Rephosphorylierungs-Gleichgewicht. Biochem.Pharmakol. 2, 163 (1972).
67. SCHRADER, G.: Die insektiziden Phosphorsäureester. Angew.Chem. 69, 86 (1957).
68. WILSON, I.B.: AChE. XI. Reversibility of tetraethylpyrophosphate inhibition. J.Biol.Chem. 190, 111 (1951).
69. - Mechanism of hydrolysis. II. New evidence for an acylated enzyme as an intermediate. Biophys.Biochem. Act. 7, 520 (1951).
70. - AChE. XIII. Reactivation of alkylphosphate-inhibited enzyme. J.Biol.Chem. 199, 113 (1952).
71. - , S.GINSBURG: A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited AChE. Biochem.Biophys.Acta 18, 168 (1955).
72. WITTER, R.F.: Measurement of blood cholinesterase. Arch.Environm.Health 6, 537 (1963).
73. ZECH, R., W.D. ERDMANN, H. ENGELHARD: Grenzen der Therapie mit Oximen bei Vergiftungen mit insektiziden Alkylphosphaten. Arzneim.Forsch. 17, 1196 (1967).

Lebenslauf

Am 10. Dezember 1942 wurde ich, Brigitte-Silvie Bitter, als Tochter der Eheleute Luise Elstermann, geb. Meyer und Dr. jur. Heinrich Elstermann in Osnabrück geboren. Dort besuchte ich die Grundschule von 1949 bis 1953 und das Gymnasium für Mädchen von 1953 bis zum Abitur im Jahre 1962.

Die zweijährige Apotheker-Praktikantenzeit verbrachte ich anschließend in Osnabrück. Nach dem pharmazeutischen Vor-examen im Frühjahr 1964 wurde ich zum Sommersemester 1964 an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Fribourg/Schweiz immatrikuliert, von wo ich nach dreise-mestrigem Pharmazie-Studium zum Wintersemester 1965 an die Freie Universität Berlin überwechseln konnte. Im Ok-tober 1967 bestand ich das pharmazeutische Staatsexamen. Ein weiteres Semester blieb ich an der Freien Universität, um an zwei biochemischen Praktika teilzunehmen.

Seit 1967 bin ich mit dem Arzt Dr.Dr. Klaus Peter Bitter aus Osnabrück verheiratet. Meine Approbation als Apothe-ker erhielt ich im Jahre 1969. Im Oktober 1969 begann ich meine Doktorarbeit unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Kewitz im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin. Dort werde ich in Zusammenarbeit mit meinem Mann in der Forschung zu dem Thema "Chemotherapie maligner Tu-moren" biochemisch-pharmakologische Arbeiten übernehmen.

Einleitung

Die vorliegende Arbeit ist eine Untersuchung über die Entwicklung der deutschen Literatur im 19. Jahrhundert. Sie ist in drei Teile gegliedert: I. Die Romantik, II. Die Realismus, III. Die Moderne. In jedem Teil werden die wichtigsten Autoren und Werke behandelt. Die Arbeit ist für die Fachwissenschaftler und die interessierten Laien geeignet. Sie ist in deutscher Sprache verfasst und enthält viele Beispiele und Zitate. Die Arbeit ist in drei Teile gegliedert: I. Die Romantik, II. Die Realismus, III. Die Moderne. In jedem Teil werden die wichtigsten Autoren und Werke behandelt. Die Arbeit ist für die Fachwissenschaftler und die interessierten Laien geeignet. Sie ist in deutscher Sprache verfasst und enthält viele Beispiele und Zitate.

